

**OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS BASADAS EN DIÓXIDO DE
SILICIO ENCAPSULADO EN UNA MATRIZ DE QUITOSANO Y GLICEROL
ORGÁNICO A TRAVÉS DEL MÉTODO DE EVAPORACIÓN LENTA PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**WILSON FERNANDO PANTOJA YELA
OSCAR MAURICIO VELEZ TABARES**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2011**

**OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS BASADAS EN DIÓXIDO DE
SILICIO ENCAPSULADO EN UNA MATRIZ DE QUITOSANO Y GLICEROL
ORGÁNICO A TRAVÉS DEL MÉTODO DE EVAPORACIÓN LENTA PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**WILSON FERNANDO PANTOJA YELA
OSCAR MAURICIO VELEZ TABARES**

**Proyecto de Grado para optar al título de
Ingeniero Biomédico**

**Director
CLARA EUGENIA GOYES LOPEZ
Dra. Ing. con énfasis en Ingeniería de Materiales**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2011**

Nota de aceptación:

Aprobado por el comité de grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de Ingeniero Biomédico.

Ingeniero Mauricio Barrera

Jurado

Ingeniero José Mina

Jurado

Santiago de Cali, 23 de Febrero de 2012

Culmina una de las etapas más esperadas e importantes de mi vida en la que agradezco y dedico a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi padre Mario Vélez, por los ejemplos de constancia y perseverancia que lo caracterizan y que me ha inculcado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su cariño; a mi madre Martha Lucia Tabares, por haberme apoyado en todo momento, por sus valores, por la motivación y constantes consejos, que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis familiares; a mi tío Bernardo, a mi tío Orlando, a mi tío Guillermo, a mi tía Yolanda, a mi hermana Lina, a mi sobrino Juan, a mi prima Katherine, a mi prima Juliana que me acompaña desde el cielo, a mis abuelos y bisabuelos que en paz descansen, a todos ellos y muchos otros miembros de mi gran familia que si nombrara sobrepasarían esta y muchas páginas más, que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis, por ser el ejemplo de una familia unida y llena de valores de la cual aprendí demasiado.
¡Gracias a ustedes!

A mis maestros; por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

A mis amigos; que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos y compartiendo grandes aventuras, sonrisas y triunfos: Diana Marcela Riascos, Loly Ardila, Diana Araujo, Heydy Mosquera, a Jorge Derazo, Bryan Pillimurt. A mi compañero de tesis Fernando Pantoja por su gran amistad y su perseverancia participando de forma directa en la elaboración de este trabajo de grado.

Oscar Mauricio Vélez

A DIOS.

Por sus infinitas bendiciones, gracias por permitirme llegar hasta esta instancia de mi vida, gracias por cada minuto, hora y días que me has permitido conocerte y dar fe que eres un Dios vivo.

A MIS PADRES.

SONIA YELA ROMO y WILSON PANTOJA ACOSTA quienes me enseñaron a valorar cada instante de mi vida, me enseñaron a luchar por lo que quiero y puedo lograr, gracias por darme su amor, cariño y apoyo incondicional, gracias por sus consejos. Sin ustedes, todo esfuerzo sería en vano porque son mi razón de ser y existir. ¡GRACIAS POR DARME LA VIDA!

A MI FAMILIA.

Gracias por su apoyo incondicional, mis abuelos: Aura, Rubiela, Gerardo, Marco Polo. Mis bisabuelos: Elvira, Lina, Herman (que Dios los tenga en su gloria). Mis tíos: Harolth (gracias por su apoyo y comprensión), Helena, Álvaro, Henry (q.e.p.d), Nelsa, Omaira, Patricia, Aylem, Edwar, Lipcio, Zenaida. Mis hermanas: Sahira, Camila. Mis primos: Sebastián, Esteban, María, Dayana, Lislihe, Linda, Mafe, Jesús, Ángela, Julieth, Jhon, Luisa, Magda, Ana, Jairo. Roberto (gracias por su cariño y apoyo). Andrea (gracias por su amor, apoyo, compañía, y a su familia gracias)

A MIS AMIGOS.

Gracias por su compañía y su amistad incondicional, Álvaro, Giovanny, Martin, Marcela, Diana, Loly, Heidy, Oscar quien me brindo su amistad y fue parte de este logro.

Wilson Fernando Pantoja Yela

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a todos aquellos que, de alguna u otra manera, contribuyeron en la realización del presente trabajo.

Profesora Clara Eugenia Goyés López, Doctora en Ingeniería de Materiales de la Universidad del Valle, integrante del Grupo de Investigación de Materiales Avanzados para Micro y Nano Tecnología IMAMNT de la Universidad Autónoma de Occidente, Directora del Trabajo de Grado.

Profesora Luz Elena Vinasco, estadística, Magister en Ciencias Agrarias de la Universidad del Valle, profesora de la Pontificia Universidad Javeriana Cali.

Profesor Faruk Fonthal Rico, Doctor en Ingeniería Electrónica de la Universidad Rovira i Virgili - España, Director del Grupo de Investigación de Materiales Avanzados para Micro y Nano Tecnología IMAMNT de la Universidad Autónoma de Occidente.

Profesora Paola Andrea Neuta Arciniegas, Bacterióloga de la Universidad del Valle, Directora del Programa de Ingeniería Biomédica de la Universidad Autónoma de Occidente.

Profesor Oscar Checa, Doctor en física de la Universidad del Valle, profesor hora cátedra de la Universidad Autónoma de Occidente.

Ingeniero Heberth Gonzalez, Ingeniero eléctrico, Coordinador de laboratorios de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Occidente.

Ingeniero David Fernández, Magíster en Ingeniería Industrial de la Pontificia Universidad Javeriana de Cali, Ingeniero Mecatrónico de la Universidad Autónoma de Occidente.

Jennifer Lucumí Vargas, Laboratorista Clínico de la Universidad del Valle, encargada del Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente.

José Pereira, Asistente de Laboratorio de Materiales de la Universidad Autónoma de Occidente.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| GLOSARIO | 19 |
| RESUMEN | 24 |
| INTRODUCCIÓN | 26 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 31 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 32 |
| 4. ANTECEDENTES | 33 |
| 4.1. QUITINA | 33 |
| 4.2. CAMPOS DE APLICACIÓN DEL QUITOSANO | 34 |
| 4.3. PELÍCULAS DE QUITOSANO | 38 |
| 4.4. GLICEROL | 38 |
| 4.5. DIÓXIDO DE SILICIO | 39 |
| 4.6. MÉTODO DE EVAPORACIÓN LENTA | 40 |
| 4.7. COMPORTAMIENTO MATERIALES POLÍMERICOS | 40 |
| 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 42 |
| 5.1. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS A PARTIR DE GLICEROL ORGÁNICO Y QUITOSANO | 42 |
| 5.2. PROCESOS REALIZADOS, EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS PARA LA FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS | 42 |
| 5.2.1 Diseño experimental | 45 |
| 5.2.2 Etapa 1: Medición de glicerol orgánico | 46 |
| 5.2.3 Etapa 2: Medición de quitosano | 47 |
| 5.2.4 Etapa 3: Preparación de ácido acético al 1% | 49 |
| 5.2.5 Etapa 4: Disolución del quitosano | 51 |
| 5.2.6 Etapa 5: Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico de maíz | 52 |
| 5.2.7 Etapa 6: Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico vegetal | 54 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.8 Etapa 7: Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico de grasa animal | 54 |
| 5.2.9 Etapa 8: Depósito de mezclas en tubos de ensayo | 55 |
| 5.2.10 Etapa 9: Centrifugado de la mezcla | 57 |
| 5.2.11 Etapa 10: Depósito de mezclas en moldes de teflón | 58 |
| 5.2.12 Etapa 11: Cubrimiento de mezcla con campana de acrílico | 58 |
| 5.2.13 Etapa 12: Evaporación de mezcla a temperatura ambiente | 60 |
| 5.2.14 Etapa 13: Secado de la mezcla a 40 °C | 61 |
| 5.3. PRUEBAS DE RESISTENCIA MECÁNICA PARA ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODO DE OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS CON LAS CARACTERÍSTICAS ADECUADAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS | 62 |
| 5.4. ENCAPSULAMIENTO DEL DIÓXIDO DE SILICIO EN LA MATRIZ POLIMÉRICA QUE PRESENTÓ LAS MEJORES CARACTERÍSTICAS DE RESISTENCIA MECÁNICA | 66 |
| 5.5. TÉCNICA PARA EL DIAGNOSTICO CITOTÓXICO | 69 |
| 5.5.1. Viabilidad celular | 69 |
| 5.6. PRUEBAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS (SEM) | 72 |
| 5.6.1 Preparación de las muestras | 73 |
| 5.6.2 Proceso llevado a cabo para las pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido a las películas poliméricas | 75 |
| 6. ANÁLISIS Y RESULTADOS | 77 |
| 6.1. OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS | 77 |
| 6.1.1. Obtención de quitosano líquido | 77 |
| 6.1.2. Obtención de soluto a partir de quitosano diluido y glicerol | 77 |
| 6.1.3. Obtención de películas poliméricas de quitosano y glicerol, a través del método de evaporación lenta | 77 |
| 6.2. RESULTADO DISEÑO EXPERIMENTAL | 78 |
| 6.3. ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS | 81 |
| 6.4. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS QUITOSANO, GLICEROL DE MAÍZ Y SiO ₂ | 91 |
| 6.5. ANÁLISIS DE CITOTÓXICIDAD | 92 |
| 6.6. ANÁLISIS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO | 103 |
| 6.6.1 Muestras recubiertas con oro en la Cámara de Vacío Denton Vacuum | 103 |
| 6.6.2 Resultados obtenidos para las pruebas de Microscopía Electrónica de Barrido | 103 |
| 7. CONCLUSIONES | 105 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| 8. RECOMENDACIONES | 107 |
| GRUPOS DE INVESTIGACIÓN | 109 |
| BIBLIOGRAFÍA | 110 |
| ANEXOS | 113 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Equipo utilizado para medir las proporciones de glicerol utilizadas “micropipeta” (A), Deposito de proporciones de glicerol en recipientes (B) | 47 |
| Figura 2. Quitosano utilizado (A), Paleta para tomar el polvo de quitosano y recipiente para depositarlo (B), Pesa con campana para medir el quitosano (C), cantidad exacta de quitosano obtenida a partir de los cálculos, observada en el indicador digital de la pesa (D). | 48 |
| Figura 3. Acido acético al 100% (A), agua destilada (B) | 49 |
| Figura 4. Baker mezcla de agua destilada y acido acético al 100% (A) Acido acético al 1% (B) | 50 |
| Figura 5. Deposito de quitosano en Baker con agitador magnético (A), mezcla de acido ácido acético con quitosano (B), plancha de agitación magnética (C), Agitación de las mezclas a 7000 RPM (D) | 51 |
| Figura 6. Mezcla de quitosano y acido acético después de transcurridas 6 horas de agitación (A) | 52 |
| Figura 7. Proceso para agregar glicerol a quitosano diluido “concentración glicerol de maíz alta” (A), muestras de quitosano y glicerol de maíz en las tres concentraciones en proceso de agitación (B) | 53 |
| Figura 8. Mezcla de quitosano y glicerol de origen vegetal “concentración glicerol de origen vegetal alta” (A), muestras de quitosano y glicerol de origen vegetal en las tres concentraciones en proceso de agitación (B). Figura 10. Técnicas de caracterización del recubrimiento | 54 |
| Figura 9. Mezcla de quitosano y glicerol de grasa animal “concentración glicerol de grasa animal alta” (A), muestras de quitosano y glicerol grasa animal en las tres concentraciones en proceso de agitación (B) | 55 |
| Figura 10. Medición con pipeta de 12,7 ml de cada tipo de glicerol en su diferente concentración para depósito en tubos de ensayo (A), deposito de mezclas en tubos de ensayo (B), | |

| | |
|---|----|
| tubos de ensayo con mezclas (C) | 57 |
| Figura 11. Centrifuga empleada para dicho proceso (A), ubicación de los tubos de ensayo en la centrifuga (B), parámetros establecidos y proceso de centrifugado (C) | 58 |
| Figura 12. Modelo CAD de los moldes a obtenerse (A), Maquinado de teflón para obtención de moldes (B), Moldes de teflón (C), Deposito de la mezcla en moldes de teflón (D), Mezcla depositada (E) | 59 |
| Figura 13. Cubrimiento de los moldes con la campana de acrílico (A) | 60 |
| Figura 14. Nivelador (A), Ubicación de los moldes con las mezclas (B), Estado de las mezclas después de transcurrido el tiempo establecido (C) | 61 |
| Figura 15. Horno (A), Estado de las mezclas después de transcurridas 46 horas en el horno a 40 °C (C) | 62 |
| Figura 16. Área establecida por la norma ASTM D882-10 para pruebas de resistencia mecánica en polímeros | 63 |
| Figura 17. Maquina universal de ensayos INSTRON (A), Distancia entre grips de la maquina universal INSTRON (B) | 64 |
| Figura 18. Bosquejo de película polimérica obtenida para las pruebas de resistencia mecánica | 64 |
| Figura 19. Ubicación de la película polimérica en la maquina universal INSTRON (A) | 65 |
| Figura 20. Proceso para determinación de propiedades mecánicas de la película polimérica (A) | 66 |
| Figura 21. Manipulación del dióxido de silicio (A), Calibración de la balanza de precisión (B), Deposito del dióxido de silicio en la balanza (C), Peso del dióxido de silicio (D) | 67 |
| Figura 22. Agitación de la mezcla de quitosano, glicerol y dióxido de silicio (A) | 68 |
| Figura 23. Películas de quitosano, glicerol y | |

| | |
|---|-----------|
| dióxido de silicio encapsulado (A) | 68 |
| Figura 24. Extracción de sangre por venopunción (A), tubo con sangre (B), tubos con sangre de los distintos pacientes (C) | 70 |
| Figura 25. Autoclave (A), implementos en proceso de esterilización (B) | 71 |
| Figura 26. Sangre centrifugada (A), separación de cadena de linfocitos (B), tubo de ensayo después de lavado de linfocitos (C), preparación del antibiótico (penicilina y gentamicina) (D), Mezcla de linfocitos, antibiótico y RPMI (E), Deposito de la película polimérica en la mezcla de linfocitos, antibiótico y RPMI (F), Muestras en cámara de CO2 (G) | 71 |
| Figura 27. Principio de funcionamiento del SEM, según componentes | 73 |
| Figura 28. Cámara de Vacío Denton Vacuum | 74 |
| Figura 29. Muestras de películas poliméricas listas para ser introducidas a la Cámara de Vacío Denton Vacuum para el proceso de recubrimiento con oro | 74 |
| Figura 30. Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6490LV | 75 |
| Figura 31. Ubicación de las muestras en Electrónico de Barrido JEOL JSM-6490LV | 75 |
| Figura 32. Películas poliméricas transcurrido el tiempo de secado (A), Película polimérica obtenida (B) | 78 |
| Figura 33. Gráficos de contorno humedad Vs concentración para obtener cantidad optima de glicerol a utilizar para la fabricación de películas poliméricas con alta deformación | 79 |
| Figura 34. Proporciones porcentuales optimas de los reactivos empleados para la fabricación de películas poliméricas | 81 |
| Figura 35. Curva de tensión Vs deformación para las pruebas de resistencia mecánica de la piel | 84 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 36. Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz en sus tres concentraciones (baja, media y alta) | 84 |
| Figura 37. Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol vegetal en sus tres concentraciones (baja, media y alta) | 85 |
| Figura 38. Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol grasa animal en sus tres concentraciones (baja, media y alta) | 85 |
| Figura 39. Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz en sus tres concentraciones (baja, media y alta) | 86 |
| Figura 40. Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol vegetal en sus tres concentraciones (baja, media y alta) | 86 |
| Figura 41. Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol grasa animal en sus tres concentraciones (baja, media y alta) | 87 |
| Figura 42. Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz bajo (A), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz medio (B), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz alto (C), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol vegetal bajo (D), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol vegetal medio (E), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol vegetal alto (F), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de grasa animal bajo (G), Grafico de | |

| | |
|--|-----|
| esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de grasa animal medio (H), Grafico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de grasa animal alto (I) | 88 |
| Figura 43. Histograma que representa el módulo de Young vs concentración de glicerol | 90 |
| Figura 44. Matriz de conteo cámara de newbauer (A), Linfocitos viables (B) y (C), linfocito no viables (D) | 92 |
| Figura 45. Control positivo “película polimérica, quitosano y glicerol maíz (A), Muestra UNO “Película polimérica, quitosano, glicerol maíz y dióxido de silicio en baja proporción (B), Muestra DOS “Película polimérica, quitosano, glicerol maíz y dióxido de silicio en media proporción (C), Muestra TRES “Película polimérica, quitosano, glicerol maíz y dióxido de silicio en alta proporción (D), Control negativo “caucho” (E) | 96 |
| Figura 46. Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control positivo (película polimérica de quitosano y glicerol maíz), durante los 3 días | 97 |
| Figura 47. Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control muestra uno (quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en baja proporción), durante los 3 días | 98 |
| Figura 48. Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control muestra dos (quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en mediana proporción), durante los 3 días | 98 |
| Figura 49. Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control muestra tres (quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en alta proporción), durante los 3 días | 99 |
| Figura 50. Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control negativo (caucho) durante los 3 días | 99 |
| Figura 51. Porcentaje de viabilidad celular para cada una de las muestras transcurridos los tres días de conteo | 102 |
| Figura 52. Muestras recubiertas con oro en la Cámara | |

Figura 53. Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido para película polimerica de quitosano, glicerol maiz alta concentracion y dióxido de silicio en baja concentracion (0,25%) (A), Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido para película polimerica de quitosano, glicerol maiz alta concentracion y dióxido de silicio en media concentracion (0,5%) (B), Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido para película polimerica de quitosano, glicerol maiz alta concentracion y dióxido de silicio en alta concentracion (0,75%) (C)

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|-----------|
| Cuadro 1. Aplicaciones del quitosano en diversos campos | 35 |
| Cuadro 2. Procesos, reactivos y equipos utilizados para la elaboración de las películas poliméricas | 42 |
| Cuadro 3. Tipos de material, presentación y uso de cada compuesto | 44 |
| Cuadro 4. Concentración de glicerol utilizado | 46 |
| Cuadro 5. Cantidad y concentración de los materiales empleados para la obtención del ácido acético al 1 % | 50 |
| Cuadro 6. Proporción de ácido acético al 1 % y quitosano empleados para la preparación de la mezcla | 51 |
| Cuadro 7. Proporciones de glicerol de maíz y quitosano diluido en ácido acético empleadas para la mezcla | 53 |
| Cuadro 8. Proporciones de glicerol vegetal y quitosano diluido en ácido acético empleadas para la mezcla | 54 |
| Cuadro 9. Proporciones de glicerol animal y quitosano diluido en ácido acético empleadas para la mezcla | 55 |
| Cuadro 10. Receta o concentraciones adecuadas para la fabricación de las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz, obtenidas a partir del desarrollo del diseño experimental | 56 |
| Cuadro 11. Distribución de la mezcla en tubos de ensayo | 80 |
| Cuadro 12. Proporciones porcentuales óptimas de los reactivos empleados para la fabricación de películas poliméricas | 81 |
| Cuadro 13. Datos promedio de esfuerzo porcentual y deformación obtenidos para las películas poliméricas | 82 |
| Cuadro 14. Comparación entre datos de deformación y tensión obtenidas con las pruebas de resistencia mecánica de las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz con datos de deformación y tensión de películas poliméricas ya existentes | 83 |
| Cuadro 15. Matriz de conteo celular del cultivo de linfocitos | |

| | |
|--|------------|
| (conteo cada 24 horas) | 91 |
| Cuadro 16. Receta o concentraciones adecuadas para la fabricación de las películas poliméricas de quitosano, glicerol de maíz y SiO₂ | 94 |
| Cuadro 17. Estadística de linfocitos viables para cada muestra durante los tres días | 100 |
| Cuadro 18. Estadística de linfocitos no viables para cada muestra durante los tres días | 100 |
| Cuadro 19. Comparación estadística para determinación de viabilidad celular | 101 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|------------|
| ANEXO A. Norma ASTM D82-10 | 112 |
| ANEXO B. Material safety data sheet (msds) dióxido de silicio (SiO₂) | 123 |
| ANEXO C. Formulario de consentimiento informado | 128 |
| ANEXO D. Procedimiento de la técnica azul de tripán para evaluar biocompatibilidad celular | 133 |
| ANEXO E. Certificado de calidad glicerina, laboratorio de ensayos biodiesel, operado por sgs Colombia S.A | 135 |
| ANEXO F. Certificado de análisis quitosano, sigma aldrich, bm science and service ltda | 136 |

GLOSARIO

ACIDO ACÉTICO: es un líquido higroscópico, que solidifica a 16,6 °C, incoloro y de olor punzante (a vinagre). Es soluble en agua, etanol, éter, glicerina, acetona, benceno, y tetracloruro de carbono. Es insoluble en sulfuro de carbono. Se obtiene por oxidación, a partir de alcohol etílico.

AGUA DESTILADA: es aquella que como todo tipo de agua su composición se basa en la unidad de moléculas H₂O, solo que se le han eliminado las impurezas e iones mediante la destilación.

ANTIBACTERIANO: quimioterápico que actúa inhibiendo la actividad de la topoisomerasa, enzima que produce el superenrollamiento de la cadena del DNA bacteriano.

APÓSITO: los apósitos son vendajes especiales que bloquean los gérmenes y mantienen el sitio del catéter seco y limpio

ASTM D882-10: método de prueba estándar para las propiedades de tracción de Láminas de plástico.

AUTOCLAVADO: proceso mediante el cual, por medio de la presión y temperaturas elevadas se destruyen gérmenes patógenos.

AZUL DE TRIPÁN: indicador o colorante implementado en procesos de evaluación de biocompatibilidad con técnicas de viabilidad celular.

BIOCOMPATIBILIDAD: propiedad de los materiales para interactuar con un medio fisiológico, sin generar alteraciones o una respuesta inmunológica.

BIODEGRADABLE: sustancia que puede ser descompuesta con cierta rapidez por organismos vivos, los más importantes de los cuales son bacterias aerobias. Sustancia que se descompone o desintegra con relativa rapidez en compuestos simples por alguna forma de vida como: bacterias, hongos, gusanos e insectos.

BIOMATERIAL: material diseñado para ser implantado o incorporado dentro de un sistema vivo, con el objeto de sustituir o regenerar tejidos vivos y sus funciones.

CEA: autoinjerto epitelial cultivado.

CITOTÓXICIDAD: poder destructor con respecto a las células. Su destrucción puede ser provocada por anticuerpos activos en presencia de complemento, contra células determinadas; o directamente por células agresivas, linfocitos (linfocitos K) o macrófagos: en este caso se trata de citotoxicidad por mediación celular.

COLÁGENO: es una proteína fibrosa que forma el tejido conectivo, y que en los mamíferos y aves constituye una proporción muy importante de las proteínas totales, del orden de un cuarto del total, lo que la hace la mayoritaria.

COMPUESTO: es una sustancia formada por la unión de dos o más elementos de la tabla periódica. Una característica esencial es que tiene una fórmula química.

CRUSTÁCEO: animal invertebrado con respiración branquial que tiene dos pares de antenas y el cuerpo cubierto por un caparazón duro y flexible.

DESACETILACIÓN: eliminación de un grupo acetilo (COCH_3) de una molécula. Es una reacción importante en varios ciclos bioquímicos, incluyendo el ciclo de Krebs.

DIÓXIDO DE SILICIO: es una sustancia amorfa que se produce sintéticamente mediante un proceso de hidrólisis en fase de vapor, que da sílice pirogénica, mediante un proceso húmedo, que da sílice precipitada, gel de sílice, o sílice hidratada.

DERMIS: la dermis es la capa de piel situada bajo la epidermis y firmemente conectado a ella. A la cara interna de la membrana basal de la epidermis se le une la dermis.

ELASTICIDAD: se refiere a la capacidad de un sólido de volver a su forma original cuando es deformado.

EPIDERMIS: la epidermis es la capa más externa de nuestra piel. Se sitúa encima de la dermis y está formada casi exclusivamente por células epiteliales del tipo queratinocitos.

ESFUERZO MECÁNICO: es el resultado de la división entre una fuerza y el área en la que se aplica.

EVAPORACIÓN: la evaporación es un proceso físico en el que un líquido o un sólido se convierten gradualmente en gas.

GLICEROL: también conocido como glicerina o 1, 2,3 propanotriol, es un compuesto alcohólico con tres grupos -OH (hidroxilos). Posee un aspecto de líquido viscoso, no tiene color, pero sí un característico olor, además de un sabor dulzón. Además el glicerol es un compuesto higroscópico, lo que quiere decir que tiene la capacidad de ceder o absorber la humedad presente en el medio ambiente que lo rodea.

GLUCOSAMINA: es un amino azúcar que actúa prominentemente como precursor de la síntesis bioquímica en la glicosilación de las proteínas, participe en la formación de los cartílagos, articulaciones, tendones y de los ligamentos.

HIDROGEL: son sistemas en estado coloidal con apariencia sólida.

HIGROSCÓPICOS: todos los compuestos que atraen agua en forma de vapor o líquido de su ambiente.

HOMOGENEIDAD: mezcla de varias sustancias que da como resultado una sustancia de estructura y composición uniforme.

IN-VITRO: se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera un organismo vivo.

LINFOCITO: leucocito de pequeño tamaño, de núcleo esférico y escaso citoplasma, que se halla en la linfa y en la sangre y cuya función es reconocer a los antígenos y sintetizar anticuerpos.

MATRIZ: conjunto de elementos químicos del mismo tipo que comparten un nombre común.

MODULO DE YOUNG: es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica una fuerza. Este comportamiento fue observado y estudiado por el científico inglés Thomas Young.

MSDS: “material safety data sheet”

NANOFIBRA: es una única y revolucionaria tecnología de tejido que es cientos de veces más finos que un cabello humano.

NANÓMETRO: es la unidad de longitud que equivale a una milmillonésima parte de un metro. Recientemente la unidad ha cobrado notoriedad en el estudio de la nanotecnología.

N-ACETILGLUCOSAMINA: es una de las formas de glucosamina, un reactivo que se encuentra naturalmente en el cuerpo, puede provenir de fuentes naturales como conchas exteriores de mariscos, así como fuentes sintéticas. Glucosamina como un suplemento alimenticio se utiliza para la osteoartritis, dolor de rodilla, dolor de espalda, pérdida de peso y glaucoma.

PARTÍCULA: elemento más pequeño en que puede dividirse una sustancia sin alterar sus propiedades físicas y químicas.

PLASTIFICANTE: un plastificante es una sustancia que cuando se añade a un material, normalmente a un plástico, da como resultado un producto flexible y más fácil de manejar.

POLIHIDROXIALCOHOL: cadenas carbonadas en las que los carbonos presentan un grupo OH y un radical H.

POLÍMERO: los polímeros son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. La materia está formada por moléculas que pueden ser de tamaño normal o moléculas gigantes llamadas polímeros. Los polímeros se producen por la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de las formas más diversas

POLISACÁRIDO: son compuestos formados por la unión de muchos monosacáridos. Pertenecen al grupo de los glúcidos y cumplen la función tanto de reserva energética como estructural. Los polisacáridos son polímeros cuyos monómeros son los monosacáridos que se unen repetidamente mediante enlaces glucosídicos, formando cadenas en su estructura molecular.

PRE – SPUTTERING: método preliminar a un proceso asistido por plasma para tratamientos superficiales y limpieza de entornos.

PSEUDOPLASTICIDAD: comportamiento en el cual los materiales poliméricos ven reducida su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación. Es marcada dependiendo la distribución de pesos moleculares y de la estructura del polímero. Se puede explicar en base a la formación y ruptura de interacciones entre las moléculas del polímero y al desenmarañamiento de las mismas.

PUNTO DE RUPTURA: deformación máxima del material.

QUEMADURA: una quemadura es una lesión en los tejidos cutáneos, generalmente ocasionada por un exceso de calor. La gravedad de una quemadura depende de la profundidad del compromiso tisular. Las quemaduras pueden dividirse en tres categorías: se hace referencia a ellas como quemaduras de primero, segundo y tercer grado.

QUITINA: polisacárido que constituye el material principal del que está formado el esqueleto externo de los artrópodos. La quitina está formada por hidrato de carbono nitrogenado, es de color blanco e insoluble en agua; la quitina se puede encontrar en el esqueleto de los cangrejos.

QUITOSANO: es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Derivado de la quitina.

REGENERACIÓN: capacidad que poseen ciertos organismos vivos para restaurar un tejido perdido o lesionado o de hacer crecer nuevamente una parte de su cuerpo perdida por causa accidental o fisiológica.

REPETITIVIDAD: pruebas llevadas a cabo al mismo material, usando el mismo equipo en el mismo día.

REPRODUCIBILIDAD: comparación de dos valores cercanos para el mismo material operando diferente equipo en diferentes días.

SILICIO: es un elemento químico metaloide, número atómico 14 y situado en el grupo 4 de la tabla periódica de los elementos formando parte de la familia de los carbonoides de símbolo Si. Es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre (27,7% en peso) después del oxígeno.

SUERO BOBINO FETAL: sustancia rica en componentes proteínicos que sirve para el enriquecimiento de medios de cultivo, implementada en procesos de separación celular.

SUSTRATO: material base que se ve expuesto a transformaciones físico-químicas superficiales, este puede ser de tipo metálico, cerámico, polímero o compuesto.

TEFLÓN: el teflón es un polímero muy resistente que fue descubierto por casualidad en el año 1938 por un trabajador de la empresa Du Pont llamado Roy J. Plunkett,. El teflón es resistente a temperaturas muy altas e impide además sustancias se adhieran a la superficie de este.

TEJIDO: un tejido es un conjunto de células similares que suelen tener un origen embrionario común y que funcionan en asociación para desarrollar actividades especializadas.

TENSIÓN: es la fuerza interna aplicada, que actúa por unidad de superficie o área sobre la que se aplica. También se llama tensión, al efecto de aplicar una fuerza sobre una forma alargada aumentando su elongación.

TRACCIÓN: esfuerzo a que está sometido un cuerpo por la aplicación de dos fuerzas que actúan en sentido opuesto, y tienden a estirarlo.

ÚLCERA: una úlcera es toda lesión de la piel o membrana mucosa con forma crateriforme (forma de un cráter, al perderse parte del tejido) y con escasa o nula tendencia a la cicatrización.

VIABILIDAD CELULAR: ensayo preliminar a la implementación de la técnica de citotoxicidad, el cual evalúa la calidad de las células que estarán expuestas a un material en prueba.

RESUMEN

En el presente estudio se obtuvieron películas poliméricas, basadas en la combinación de quitosano, glicerol orgánico y nanopartículas de dióxido de silicio, a través del método de evaporación lenta, con el propósito de que puedan ser usadas para una posible aplicación en Ingeniería de tejidos. El procedimiento utilizado arroja como resultado, que en condiciones ambientales y usando una campana acrílica para cubrir las muestras, se presenta un adecuado secado del compuesto. En función de lograr un procedimiento que conduzca a una exploración más precisa en la fabricación de nuevos materiales, en este estudio se realizó un diseño experimental mediante el diseño factorial 3^2 , superficies de respuesta y optimización simultánea de varias variables, buscando maximizar las propiedades mecánicas del compuesto. Para ello a través de este diseño se tuvieron como base 2 factores, en este caso concentración de glicerol y tipo de glicerol, por lo cual se llevaron a cabo 9 experimentos con 5 replicas obteniendo así 45 muestras finales¹. En este sentido, se logró obtener los valores óptimos para la combinación de los reactivos que garantice que el compuesto cuente con las propiedades mecánicas deseadas (alto grado de deformación y buena resistencia) para las posibles aplicaciones biomédicas que se pretende.

El método de evaporación lenta permitió obtener películas poliméricas delgadas de aproximadamente 100 μm de espesor, a partir de la combinación de quitosano con tres tipos de glicerol de origen orgánico, maíz, vegetal y grasa animal, a diferentes concentraciones. Todas las muestras (en total 45 según el diseño realizado) fueron sometidas a pruebas de tracción para determinación de sus propiedades mecánicas bajo la Norma ASTM D882-10. Mediante estas pruebas se comprobó la plasticidad de las películas y el punto de ruptura mediante la curva de esfuerzo y deformación, determinando que la mayor plasticidad la poseen las películas poliméricas con mayor concentración de glicerol y la mayor resistencia mecánica la obtienen las películas poliméricas con menor concentración de glicerol.

A las películas poliméricas que obtuvieron la mejor combinación de los reactivos arrojada por el diseño experimental, en función de sus mejores propiedades mecánicas, se les realizó un encapsulamiento con nanopartículas de dióxido de silicio (12 nm) a diferentes concentraciones. El dióxido de silicio es un derivado del silicio abundante en la piel de los seres humanos, que otorga propiedades humectantes y antibacterianas a las películas, para la posible aplicación en regeneración de tejidos. En este sentido, se evaluó la

¹ FERNANDEZ, D. VINASCO, L.E. Estudio del método de evaporación lenta para la fabricación de películas poliméricas basadas en quitosano y glicerol orgánico. Pontificia Universidad Javeriana. 2011. Santiago de Cali. Colombia.

biocompatibilidad de las películas poliméricas dopadas con dióxido de silicio, a través de una prueba de viabilidad celular (citotoxicidad), obteniendo un 79% de aceptación de las películas poliméricas con el entorno fisiológico.

Palabras Clave: película, polímero, quitosano, glicerol, dióxido de silicio, evaporación lenta, tejidos, compuesto, diseño, reactivos, deformación, resistencia, espesor, orgánico, ruptura, regeneración, antibacteriana, biocompatibilidad, citotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

En la investigación biomédica se presenta un gran interés por la aplicación que tienen los biomateriales. Una de las áreas más importantes en las que actualmente se están llevando a cabo estudios científicos, es en Ingeniería de Tejidos, en la cual se busca emplear polímeros con propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad para la regeneración de tejidos.

Uno de los biopolímeros más empleados en ingeniería de tejidos es el quitosano, el cual es un biopolímero derivado de la quitina que se extrae del caparazón de los crustáceos. El quitosano posee propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad nula; tiene diversos campos de aplicación y también es usado en el tratamiento de la regeneración tisular debido a que posee características humectantes y antibacterianas².

La unión del quitosano con un plastificante da como resultado una película con una gran resistencia mecánica y gran maleabilidad, la cual puede ser empleada como apósito para la piel por sus propiedades de biocompatibilidad. De los plastificantes conocidos el más empleado para lograr obtener una película con estas características y esta textura es el glicerol orgánico³. A diferencia de otros polímeros biodegradables el glicerol posee propiedades favorables debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Este material es un polihidroxialcohol ampliamente utilizado en las industrias química, farmacéutica y cosmética en virtud de sus propiedades: Humectante, antiséptica, higroscópica y espesante. El glicerol puede ser obtenido de diversas fuentes, es obtenido de palmas, caña de azúcar y otras fuentes orgánicas. Tomando en consideración el aumento del precio de las materias primas utilizadas tradicionalmente para su obtención, se impone la búsqueda de nuevas y variadas fuentes⁴.

² KONG, M., CHEN, X., XING, K., JIN PARK, H. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action. PR China, 2010. p. 53.

³ MARTÍNEZ CAMACHO A.P., CORTEZ ROCHAA M.O., EZQUERRA BRAUERA J.M., GRACIANO VERDUGO A.Z., RODRIGUEZ FÉLIX F., CASTILLO ORTEGA M.M., YÉPIZ GÓMEZ M.S., PLASCENCIA JATOMEAA M. Journal of Carbohydrate Polymers. 82, 2010. p. 305 – 315.

⁴ KONG, M., CHEN, X., XING, K., JIN PARK, H.. Op.cit., p. 53.

En el presente proyecto también ha sido importante buscar la maximización de las propiedades mecánicas, y dar a las películas, propiedades antibacterianas y de humectación. En este sentido el glicerol y el quitosano se mezclarán con nano partículas de dióxido de silicio SiO_2 , el cual es un compuesto que se halla presente en elevada proporción en la epidermis, la dermis y el cabello para incrementar la resistencia química de la queratina. Este material juega un papel muy importante en el ser humano, pues desempeña distintas acciones entre las cuales se destacan: acción reestructurante/hidratante, acción citoestimulante, y la acción antiinflamatoria⁵.

En este estudio, los autores pretenden una exploración innovadora en donde se desea encapsular nanopartículas de SiO_2 en una matriz polimérica, esperando que su acción humectante, y demás propiedades puedan hacer parte de una película polimérica que pueda usarse para cubrir la piel. Empleando el dióxido de silicio en esta presentación, se está dando un gran avance en el estudio de ingeniería de tejidos para las ciencias biomédicas. El uso de nanopartículas permite la creación de materiales útiles/funcionales, mediante el control de la materia, observando diversos resultados y grandes aportes para las ciencias medicas como lo es la liberación de fármacos con materiales en la escala del nanometro⁶.

Por otro lado, tanto el glicerol, como el quitosano y el dióxido de silicio son sustancias que están presentes en la piel, ayudándola a mantenerse resistente, humectada y libre de bacterias. Al presentarse algún tipo de accidente que afecte la dermis, se ven afectadas las estructuras de ésta, presentándose perdida de muchos de sus componentes. Uno de los accidentes más frecuentes son las quemaduras, que pueden suceder por diversos factores. Las quemaduras son tratadas con métodos comunes, empleando para la recuperación de la zona afectada, suministro de líquidos, aplicación de medicamentos y utilización de vendajes.

Buscando que la recuperación de las zonas afectadas sea rápida y factible, el propósito de este proyecto es combinar estos tres biomateriales quitosano, glicerol y SiO_2 , con lo cual pretendemos obtener una película polimérica con

⁵ ALCALDE, M.T., DEL POZO, A. Silicio como activo en cosmética, Unidad de tecnología farmacéutica. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona. 2008

⁶ FALKE, G. ATALA, A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular, Citado el 13 octubre de 2011. Disponible en: www.sap.org.ar/staticfiles/archivos/2000/arch00_2/00_103_115.pdf

características de resistencia mecánica y maleabilidad apropiadas que pueden ser empleadas como apósitos en la piel y así facilitar la regeneración de tejidos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los países tercermundistas las quemaduras son un grave problema de salud pública, por lo que prima la prevención; sin embargo el tratamiento y su posterior rehabilitación dependen de los recursos que posea la víctima. En Colombia se estima que del año 2005 al 2010, cada fin de año se ven afectadas 471 personas por quemaduras que requieren atención médica y un tratamiento quirúrgico dado su gravedad, según cifras del Ministerio de la Protección social⁷.

Para el tratamiento de las quemaduras, en la actualidad, se emplean diversos métodos, entre los cuales se conoce un proceso de rehabilitación a través de la inserción de tejidos o injertos de piel de alta tecnología y membranas artificiales que consiste en la extracción de nuevos tipos de injertos de piel. Existe una técnica conocida como CEA (del inglés "cultured epithelial autograft" o autoinjerto epitelial cultivado), la cual usa células vivientes de la piel del paciente quemado para crecer nuevas células en películas u hojas en un laboratorio⁸.

En nuestro país es muy poco empleado dicho método, pero de igual forma se llevan a cabo diversos tratamientos para lograr la recuperación de los pacientes con quemaduras. Dichos procedimientos consisten en el lavado, desinfección y aplicación de medicamentos en las zonas afectadas. Sin embargo con la implementación de estos tratamientos, el tiempo para la recuperación del tejido en la zona afectada es prolongado y los resultados no siempre son los esperados.

Finalmente esta propuesta de investigación propone dar respuesta a la siguiente pregunta: *¿cuál es la combinación de glicerol y quitosano que puede dar como resultado una película polimérica con resistencia mecánica apropiada para una posible aplicación en regeneración de tejidos, así como también cómo*

⁷COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL, censo quemados 2005 - 2010. [en línea] [consultado 10 agosto de 2011] Disponible en internet en <http://www.cali.gov.co/publicaciones.php?id=36203>.

⁸ORTIZ RAMOS, J. SIERRA SÁNCHEZ, A. Quemaduras en el tercer mundo (tratamiento de quemados con recursos limitados). III Congreso nacional de enfermería de quemados y cirugía plástica, Zaragoza, 2008.

resulta su biocompatibilidad al adicionarse al material, nanopartículas de dióxido de silicio?

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la resistencia mecánica de una película basada en quitosano y glicerol orgánico, encapsular dióxido de silicio a esta y comprobar viabilidad celular para posible aplicación en regeneración de tejidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ⦿ Fabricar películas poliméricas a través del método de evaporación lenta a partir de la mezcla de quitosano y glicerol orgánico.
- ⦿ Determinar las propiedades mecánicas de las películas poliméricas con el método estándar para pruebas de tracción de plásticos ASTM D882-10.
- ⦿ Fabricar películas encapsulando dióxido de silicio en la matriz polimérica que haya obtenido las mejores propiedades mecánicas.
- ⦿ Determinar la viabilidad celular de las películas poliméricas que presenten la mejor resistencia mecánica, mediante la técnica de citotoxicidad.
- ⦿ Llevar a cabo pruebas de microscopia electrónica de barrido en las películas poliméricas.

3. JUSTIFICACIÓN

Es común hoy en día el uso de biomateriales en tratamientos médicos, principalmente en tratamientos para pacientes que han sufrido quemaduras, con lo cual se pretende disminuir el riesgo de infección y minimizar el tiempo de recuperación⁹. En este sentido, es de mucha importancia realizar estudios para identificar la frecuencia de personas con quemaduras que requieren el uso de tratamientos.

Para la mayoría de las personas que sufren de quemaduras graves o leves, les es más factible el acceso a obtener un sustituto, ya que es menos costoso que los tratamientos que existen hoy en día. Entre éstos últimos tratamiento se pueden mencionar por ejemplo: los injertos, donde la piel se toma de otra parte del cuerpo, otra persona o un animal como un cerdo y se une al área quemada para remplazar la piel dañada. También en algunos países cultivan piel a partir de fragmentos de prepucio de bebés circuncidados, para reparar las heridas y regenerar la dermis de quienes han sufrido quemaduras¹⁰.

Con la realización del presente proyecto se abre un gran campo en la investigación en ingeniería de tejidos y la estandarización del proceso de obtención de películas poliméricas, las cuales beneficiaran a los pacientes afectados por quemaduras en acceder a un tratamiento eficiente y de menor costo comparado con los tratamientos actuales basados en quitosano.

Si bien aún no está claro el precio al consumidor, se estima que esta piel artificial o películas provenientes de quitosano costarán cerca de 60.450 pesos colombianos /cm², un valor muy inferior a las películas sintéticas importadas que se comercializan actualmente a precios diez veces superior¹¹. Los materiales implementados para la obtención de las películas poliméricas de este proyecto tienen bajo costo, y fácil acceso ya que provienen de recursos naturales.

⁹ VALDEZ, B. SCHORR, M. VALDEZ, E. CARRILLO, M. Revista Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano, 2009.

¹⁰ CÁRDENAS, Galo. Tratamientos de paciente, 2008. [en línea] [consultado 13 junio de 2011] Disponible en internet: <http://www.quitoquimica.cl/tratamiento.html>.

¹¹ FERNÁNDEZ, Roberto. Novedoso parche a base de caparazones de crustáceos. en: Diario crónica. Chile. concepción, 19 de junio del 2007.

4. ANTECEDENTES

Debido a la ubicación geográfica de nuestro país, en las costas encontramos gran cantidad de crustáceos. Por eso contamos con grandes industrias comercializadoras de dicho producto, las cuales procesan este tipo de alimento para llevarlo al mercado. En dicho proceso se extrae el caparazón de los crustáceos, el cual es desechado por la industria en nuestras costas, acumulándose en enormes basureros que constituyen un serio residuo contaminante, representando un impacto ambiental negativo.

La industria camaronera no puede hacer caso omiso de las tendencias mundiales en cuanto a la incorporación de la normativa ISO 14000. Este cambio en el procesamiento del recurso, ha traído consigo un incremento en la cantidad de desechos. Cabezas y exoesqueletos son depositados en vertederos de basura a cielo abierto o en el mar, constituyendo una fuente de contaminación ambiental. Se estima que los desechos de camarón constituyen alrededor del 30% en peso del recurso; en 1994 se produjeron 990 ton de desechos y en 1995 1.090 ton¹².

Se han llevado a cabo estudios que demuestran que estos residuos contienen un polímero natural denominado quitina, sustancia que tiene aproximadamente 200 usos en la industria medicinal, farmacéutica, alimenticia, agrícola, tratamiento de efluentes, entre otras¹³.

4.1 QUITINA

La quitina es un biopolímero de N-acetilglucosamina y residuos de glucosamina que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, y constituye la segunda sustancia más abundante, después de la celulosa. Es un polisacárido

¹² LEMUS CENTES, Juan Fernando. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón, Facultad de Ingeniería. Universidad Rafael Landívar, Octubre de 2007.

¹³ CAPRILE, María Daniela. Obtención y Utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de Crustáceos. 2007. Tesis. Bahía Blanca, España. p. 84.

no tóxico y biodegradable que forma una sustancia cornea y es el principal constituyente de exoesqueleto de insectos, crustáceos y arácnidos.

Mediante la desacetilación extensiva de la quitina se obtiene el quitosano el cual es un polisacárido de cadena lineal poco frecuente en la naturaleza. Entre las principales características del quitosano, se puede citar las siguientes¹⁴:

- Promueve la pérdida de peso (absorbe y compacta las grasas)
- Control del colesterol
- Promueve la recuperación de úlceras y lesiones
- Acción antibacterial
- Actúa como antiácido
- Inhibe la formación de placa en los dientes
- Ayuda al control de la presión sanguínea
- Previene la constipación
- Endurece los huesos (aumenta el contenido de calcio)
- Reduce los niveles sanguíneos de ácido úrico
- Acción anti tumores.

4.2 CAMPOS DE APLICACIÓN

El quitosano es un polímero empleado en diversos campos por su versatilidad a diversas aplicaciones, su no toxicidad y su biodegradabilidad. En el cuadro 1 se muestran algunos de los campos de aplicación del quitosano.

Actualmente la ingeniería de tejidos cobra gran importancia a nivel mundial, por ello se están realizando investigaciones más exhaustivas a cerca de las áreas de aplicación del quitosano, llevando a cabo estudios en el uso de dicho polímero para tratamientos dérmicos a partir del exoesqueleto del camarón¹⁵.

¹⁴ ORTIZ RAMOS. Op.cit.,

¹⁵ CAPRILE. Op.cit., p. 82.

Cuadro 1: Aplicaciones del quitosano en diversos campos

| CAMPOS DE APLICACIÓN | USOS |
|--|---|
| Tratamiento de aguas y efluentes Industriales. | Remoción de iones metálicos y pesticidas: remoción de fenoles, radioisótopos, PCBs y colorantes, recuperación de materiales sólidos de la industria alimenticia (proteínas, polisacáridos, etc). |
| Fabricación de papel | Tratamiento de superficies, papel Fotográfico |
| Medicina | Gasas, algodón, contenedor artificial de sangre, control de colesterol, inhibidor tumoral, membranas, inhibición de placas dentarias, cicatrización de heridas, piel artificial, tratamientos de enfermedades óseas, lentes de contacto, membranas de diálisis, bolsas de sangre, anticoagulante. |
| Cosmética | Maquillaje, esmalte de uñas, loción de baño, cremas, dentífrico. |
| Biología | Inmovilización de enzimas y células, separación de proteínas, cromatografía, recuperación celular. |
| Agricultura | Recubrimientos de semillas y frutas (film), fertilizante, fungicida, antivirósico. |
| Alimenticia | Remoción de colorantes, conservantes, estabilizante de color, exaltador del sabor natural, preservante, antioxidante, emulsionante, aditivo de alimentos para animales. |

La quitina y el quitosano son obtenidos a partir de desechos de crustáceos, lo cual es motivo de estudio desde los puntos de vista científico, social, económico y ambiental, impulsando a la formación de industrias que obtienen y comercializan quitosano; una de las primeras industrias con este propósito fue fundada en Argentina¹⁶.

¹⁶ SÁNCHEZ B. ANDRÉS, caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos. Trabajo de grado para optar Ingeniería biotecnológica. Costa rica.: Escuela de Biología 2006. 13 p.

A partir del descubrimiento de este polímero y de las fuentes de las cuales proviene, se inicia con la investigación de diversas aplicaciones. Las aplicaciones en el campo científico y del área de la medicina, impulsaron los estudios para la utilización del quitosano en hidrogeles para el crecimiento de fibroblastos en humanos, con esta investigación se caracterizaron física y químicamente el quitosano del camarón langostino *Pleuroncodes planipes* de grado técnico y purificado. Se comprobó la efectividad del hidrogel con una porosidad determinada en el crecimiento de fibroblastos humanos¹⁷.

Otro de los métodos por los cuales fueron caracterizados este tipo de hidrogeles obtenidas a partir del quitosano fue la radiación Gamma, lo cual permite presenciar la interacción entre las cadenas de quitosano y el poli (vinil acetato) o PVA en los hidrogeles. El quitosano en solución disminuye rápidamente su peso molecular, por efecto de la radiación gamma, mientras que el PVA en solución acuosa forma hidrogeles luego de ser irradiadas a dosis mayores de 5 kGy. Sin embargo, las mezclas de quitosano y PVA forman hidrogeles en los cuales estos polímeros no se degradan significativamente y, al contrario, forman hidrogeles estables. Se presentan evidencias que sugieren que las cadenas de PVA y quitosano están entrecruzadas covalentemente. Esto se explica en términos de probabilidad de reacción de los radicales formados por radiación gamma¹⁸.

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha encontrado muchas aplicaciones, dentro de los campos de Ingeniería de Tejidos y liberación de fármacos, gracias a sus excelentes propiedades mecánicas como a su baja tasa de biodegradación. Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular¹⁹.

¹⁷ BERGER, J. REIST, M. MAYER, J.M. FELT, O. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. School of Pharmacy, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

¹⁸ CARHUAPOMA BERNABÉ, WILSON. CONTRERAS, JULIO SANTIAGO. Revista iberoamericana de polímeros. Vol. 6(4), diciembre de 2005.

¹⁹ SÁNCHEZ B. ANDRÉS, caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos. Escuela de biología. Cosa Rica 2006. 13 p.

Uno de los problemas más frecuentes y en los cuales se ha empleado el quitosano para su tratamiento son las quemaduras. Estas son lesiones de la piel, de sus anexos y hasta de los músculos y tendones del organismo. Estas son producidas por agentes físicos y químicos en sus diversas formas. Las quemaduras por calor involucran el calentamiento de los tejidos sobre un nivel donde ocurre daño irreversible de éstos. La lesión tisular es proporcional al contenido de calor del agente quemante, tiempo de exposición y conductividad de calor de los tejidos involucrados. La piel de nuestro organismo, posee una alta conductividad específica al calor, con una baja irradiación térmica, por lo tanto, la piel se sobrecalienta rápidamente y se enfría lentamente. Como resultado, el daño térmico persiste luego de que el agente se haya extinguido o haya sido removido. La gravedad de la quemadura depende de la profundidad, la extensión y localización²⁰.

A medida que avanzan las investigaciones con el quitosano se ha encontrado que posee propiedades regenerativas y por ende diversas aplicaciones clínicas. Seung- Yu Shin en el año 2005, en un experimento realizado en humanos, demostró que las membranas de Quitosano con tecnología de nanofibra podían incrementar la regeneración ósea sin presentar ningún signo de reacción inflamatoria. Lo anterior abre una puerta para utilizar estas nanofibras en regeneración ósea guiada. En el mismo año Eun-Kyoung Pang concluye que al aplicar quitosano al 0.1% en una esponja de colágeno se incrementa la síntesis de colágeno tipo I y se facilita la diferenciación de células osteogénicas; en estas condiciones existe un significativo potencial para acelerar la regeneración ósea de calota craneana en ratas con defectos óseos extensos. Un año después Hua Liu afirma que si se aplica quitosano formando parte de un sustituto óseo una mezcla constituida por Quitosano, ácido cítrico, glucosa como fase líquida, y fosfato tricálcico en polvo, se podría obtener una pasta con consistencia de masilla con buena bioactividad y citocompatibilidad que podría tener positivas aplicaciones²¹.

La implementación de quitosano en problemas dérmicos, es una de las principales aplicaciones que se están llevando a cabo en el ámbito médico. Lograr mantener una perfecta hidratación en la piel cuando se presentan daños en la piel es uno de los principales objetivos para lograr su rápida recuperación. Es por ello que incluir partículas de otro tipo de material, que al combinarlo con el quitosano, permita una satisfactoria recuperación, sería de gran importancia y un logro mayor en el área de la salud, pues el número de pacientes con problemas dérmicos causados por enfermedades o accidentes es elevado.

²⁰ PIRIZ CAMPO, Rosa. Quemaduras. EN: Enfermería Médico-Quirúrgica, 2003, p 1124-1126.

²¹ JORQUERA, RODRIGO. JORQUERA, ORLANDO. Quitosano: un Material con Propiedades Regenerativas y su Aplicación Clínica. Universidad de Chile. Octubre de 2008.

A continuación se presentan con más detalle otros materiales empleados para la fabricación de las películas poliméricas de este proyecto.

4.3 PELÍCULAS DE QUITOSANO

El quitosano se encuentra entre los materiales utilizados para la formación de películas, debido a sus propiedades filmogénicas, compatibilidad, biodegradabilidad, inocuidad y bajo costo. Los estudios realizados a estas películas, comprenden la evaluación del color, espesor, propiedades mecánicas. También se ha analizado la permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y al agua²². Las películas de quitosano tienen excelentes propiedades mecánicas que dependen en gran medida del peso molecular, de su grado de cristalinidad y el contenido de humedad de las mismas. Son delgadas, elásticas, resistentes y tienen una excelente adhesión en diferentes tipos de superficie. Poseen valores medios o moderados de permeabilidad al agua y actúan como barrera al oxígeno²³.

4.4 GLICEROL

El glicerol es un plastificante, el cual ha sido utilizado durante mucho tiempo como preservante en aloinjertos de piel, sin embargo sus cualidades antibacteriales no han sido totalmente documentadas. Posee grandes características que permiten la rápida y homogénea regeneración de piel sobre quemaduras superficiales, de segundo y de tercer grado²⁴.

La capacidad regenerativa sobre heridas de gran área, donde se encuentran comprometidas extremidades, cabeza y torso, tienen un gran desempeño curativo al utilizar Glicerol, sin embargo en la palma de la mano y el pie, quemaduras en pliegues corporales o lugares de extremo movimiento no

²² RUIZ, Jacqueline Ofelia. Caracterización reológica de emulsiones en agua estabilizadas con goma de mezquite y quitosano y su efecto en la permeabilidad de películas. Tesis de maestría. Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana, 2004. p 57.

²³ ZAMUDIO, P. Caracterización estructural de películas elaboradas con almidón modificado de plátano y quitosano. Tesis de doctorado en ciencias en desarrollo de productos bióticos. Yautepec, Mexico. Instituto Politécnico Nacional. 2008. p 39.

²⁴ RAVISHANKER R., BATH A.S., ROY R. Journal Of Burns. 29, 2008. p. 369 – 374.

permiten una buena regeneración, pues la película o membrana de glicerol no se adhiere en su totalidad. En muchos casos, donde la quemadura es de gran nivel, la aplicación de las películas o membranas de Glicerol se debe realizar en dos o más ocasiones con el fin que el tejido absorba cada vez las características regenerativas y curativas hasta lograr la sanación completa de la herida²⁵.

El glicerol puede ser obtenido de distintas fuentes, tanto orgánicas como sintéticas. El glicerol utilizado en esta investigación proviene de fuentes orgánicas como plantas, vegetales y grasa animal, abundante en la naturaleza por lo cual es de fácil acceso y de bajo costo.

4.5 SiO₂ (DIÓXIDO DE SILICIO)

El dióxido de silicio (derivado del Si) es un componente del tejido conectivo, es importante para la constitución de la piel y anejos (uñas, cabello), mucosas y huesos, activa la formación de colágeno. También forma parte de pulmones, ganglios linfáticos y glándulas suprarrenales, aumenta la capacidad de resistencia mecánica de los tejidos, está relacionada con el metabolismo cálcico e interviene con otras sustancias en la absorción de calcio de los alimentos, y estimula la fagocitosis en la defensa frente a las infecciones. El SiO₂, es el remedio principal de la supuración, fístulas óseas, caries y orzuelos, indicada en enfermedades de uñas y cabellos y raquitismo, adenitis e induraciones ganglionares, procesos de cicatrización tórpida, alteraciones vasculares de distensión (varices, hemorroides), activa la resorción de hematomas y derrames, reduce los niveles sanguíneos de ácido úrico, y para hacer frente al aspecto avejentado y sudoración nocturna, desnutrición y poca resistencia²⁶.

En los últimos años, el aprovechamiento de los residuos agroindustriales ha tomado gran importancia en la búsqueda de nuevas alternativas no convencionales como lo es la biotransformación, involucrando organismos vivos tales como cianobacterias, diatomeas, esponjas, hongos, plantas, etc. Los residuos agroindustriales contienen una cantidad sustancial de silicio en estado amorfo, el cual puede ser transformado a nanopartículas de sílice cristalino lo que le da una potencial aplicación comercial, la síntesis de nanopartículas de silicio puede llevarse a cabo a partir de anélidos de la

²⁵ RAVISHANKER. Ibid., p. 374

²⁶ ALCALDE, M.T., DEL POZO, A.. Op.cit., p. 53.

especie *Eisenia foetida* empleando tres diferentes residuos agroindustriales: cascarilla de arroz, pulpa de café y bagazo de caña como sustratos; estos residuos son sometidos a un proceso de vermicompostaje obteniendo un producto sólido (humus y huminas) el cual es calcinado para posteriormente extraer nanopartículas de óxido de silicio cristalino²⁷.

4.6 MÉTODO DE EVAPORACIÓN LENTA

El proceso de secado de los polímeros para la elaboración de películas delgadas lleva el nombre de método de evaporación lenta. El método de evaporación lenta es uno de los métodos más usados para la preparación, obtención, crecimiento y fabricación de elementos, películas, cristales, nanoestructuras y moléculas pequeñas. El método lleva su nombre debido a la descripción específica de su proceso, el cual se conoce también como “Evaporación Lenta del disolvente”, en donde en un ambiente controlado se deja en reposo la muestra a tratar con el fin que las sustancias y/o reactivos susceptibles a la evaporación, desaparezcan en un lapso también controlado²⁸.

4.7 COMPORTAMIENTO DE LOS MATERIALES POLIMÉRICOS

La plasticidad es un fenómeno que muestran ciertos materiales que se comportan como sólidos elásticos, almacenando una cierta cantidad de energía, que cuando son sometidos a un esfuerzo se deforman continuamente como un fluido, siendo el esfuerzo una función no lineal. La pseudoplasticidad es una propiedad de los polímeros, producida por el desenmarañamiento y alineación de las cadenas poliméricas, que produce una mayor separación entre ellas, siendo el resultado en ambos efectos un descenso en la viscosidad del fluido.

²⁷ ESPINDOLA GONZALEZ, M. ESTEVEZ, A.L. MARTINEZ HERNANDEZ, V.M. Obtención y caracterización microestructural de nanopartículas de SiO₂ a partir de cascarilla de arroz, pulpa de café y bagazo de caña empleando bioprocesos a base de anélidos. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis. p.1

²⁸ ESPITIA M., MUÑOZ BRAVO J.E., VARGAS C., ALMANZA O. Revista Colombiana de Física. 41, 2009. p. 360 – 364.

La curva esfuerzo vs deformación define la ductilidad de un material, que es la capacidad para fluir, es decir, la capacidad para alcanzar grandes deformaciones sin romperse. La fragilidad se define como la negación de la ductilidad. Un material poco dúctil es frágil. La proporcionalidad entre el esfuerzo y la deformación, por la ley de Hooke permite definir el módulo de Young o módulo de elasticidad²⁹.

La curva de esfuerzo vs deformación representa una deformación elástica, por lo cual se tiene un comportamiento elástico no lineal. Inicialmente se reduce el módulo de elasticidad por el desenroscado de las cadenas. Sin embargo una vez extendidas las cadenas ocurre una deformación elástica adicional al estirarse los enlaces, con un módulo de elasticidad más elevado.

²⁹ ASKELAND, D. Ciencia e ingeniería de los materiales. Tercera edición, Universidad de Missouri, editorial Thomson. p. 131.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODO PARA OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS A PARTIR DE GLICEROL ORGÁNICO Y QUITOSANO

A partir de la combinación de glicerol orgánico, quitosano y nano partículas de dióxido de silicio, se obtuvieron películas poliméricas a través del método de evaporación lenta. Se determinó a través de un diseño experimental mediante el diseño factorial 3^2 superficies de respuesta y optimización simultánea de varias variables. Para ello a través de este diseño se tuvieron como base 2 factores, en este caso concentración de glicerol y tipo de glicerol, por lo cual se llevaron a cabo 9 experimentos con 5 replicas obteniendo así 45 muestras finales, para obtener como resultado la proporción adecuada de cada uno de los componentes de la mezcla, así como también, los tiempos y procesos que deben llevarse a cabo para tener las películas con las características adecuadas para la aplicación biomédica deseada.

5.2. PROCESOS REALIZADOS, EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS PARA LA FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS

Para la fabricación de las películas poliméricas, fue necesario llevar a cabo diversos procesos, en los cuales se contó con equipos y materiales destinados a llevar a cabo cada una de las etapas. En el cuadro 2 se muestran los procesos, equipos y materiales implementados para la fabricación del compuesto.

Cuadro 2: Procesos, reactivos y equipos utilizados para la elaboración de las películas poliméricas

| PROCESO | EQUIPO | MATERIAL |
|-------------------------------------|-------------------------------|---|
| Medición de glicerol a utilizarse. | Micro pipeta | Glicerol orgánico de tres tipos (animal, vegetal y de maíz) |
| Medición de quitosano a utilizarse. | Balanza de precisión (gramos) | Quitosano |
| Preparación de ácido | Beaker 500 ml | Ácido acético al 100% y |

Cuadro 2 (continuación)

| | | |
|---|---|---|
| acético al 1% | | agua destilada |
| Disolución de quitosano | Beaker 200 ml | Ácido acético al 1% y quitosano |
| Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico maíz. | Beaker 200 ml | Quitosano diluido y glicerol de maíz |
| Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico vegetal. | Beaker 200 ml | Quitosano diluido y glicerol vegetal |
| Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico grasa animal. | Beaker 200 ml | Quitosano diluido y glicerol de grasa animal |
| Deposito de mezclas en tubos de ensayo. | Tubo de ensayo | Mezcla de quitosano y glicerol |
| Centrifugado de mezcla | Centrifuga refrigerada Hettich Universal 32 y tubos de ensayo | Mezcla de quitosano y glicerol |
| Deposito de mezcla en moldes de teflón | Moldes de teflón y tubos de ensayo | Mezcla de quitosano y glicerol |
| Cubrimiento de mezcla con campana de acrílico | Campana de acrílico y moldes de teflón | Mezcla de quitosano y glicerol |
| Evaporación de mezcla a temperatura ambiente | Campana de acrílico y moldes de teflón | Mezcla de quitosano y glicerol |
| Secado de mezcla a 40°C | Horno y moldes de teflón | Mezcla de quitosano y glicerol |
| Pruebas de resistencia mecánica para estandarización de método de obtención de películas poliméricas con elasticidad y resistencia alta para la aplicación biomédica. | Maquina Universal de ensayos INSTRON 3366 | Películas poliméricas de quitosano y glicerol orgánico. |
| Encapsulamiento del | Moldes de teflón, | Quitosano, acido |

Cuadro 2 (continuación)

| | | |
|--|--|---|
| dióxido de silicio en la matriz polimérica que presentó las mejores características de resistencia mecánica. | balanza de precisión, pipetas, micro pipetas, plancha de agitación, Beaker, tubos de ensayo, centrifuga, horno, campana de acrílico. | acético, glicerol maíz, dióxido de silicio. |
| Técnica para el diagnostico cito tóxico (Viabilidad celular). | Centrifuga, autoclave, Baker, tubos de ensayo, tubos de petri, cámara de CO ₂ , horno, jeringas. | Sangre, RPMI, azul de tripán, penicilina, gentamicina, películas poliméricas, suero fetal bovino, histopaque, consentimiento informado. |
| Pruebas de microscopia electrónica de barrido en las películas poliméricas (sem). | Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV, Camara de Vacio DENTON VACUUM. | Películas poliméricas, oro. |

En el cuadro 3 se presentan los materiales empleados para la fabricación de las películas poliméricas, la presentación física de cada compuesto y el uso para el cual se destinan.

Cuadro 3: Tipos de material, presentación y uso de cada reactivo

| MATERIAL | TIPO DE MATERIAL | PRESENTACIÓN | USO DEL MATERIAL |
|------------------------------|-------------------------|---------------------|--|
| Quitosano ALDRICH Chemistry. | Polímero | Solido (Polvo) | Mezclado con glicerol, actúa como puente para facilitar la regeneración celular y como matriz de soporte para el encapsulamiento del dióxido de silicio. |
| Glicerol USP | Plastificante | Liquido | Empleado para la |

Cuadro 3 (continuación)

| | | | |
|---|----------|-------------------------|---|
| | | | mezcla con quitosano, encargado de dar la consistencia plástica al material. |
| Dióxido de silicio (SiO ₂) Aerosil | Cerámico | Nano partículas (Polvo) | Adicionado a la mezcla de quitosano y glicerol, busca dar propiedades antibacterianas y humectantes al compuesto. |

5.2.1 Diseño experimental. Para la fabricación de las películas de quitosano, glicerol y dióxido de silicio y la maximización de las propiedades mecánicas del compuesto, fue necesario llevar a cabo un diseño experimental mediante diseño factorial 3² (2 factores: Tipo de glicerol y concentración, con 3 niveles de prueba) superficies de respuesta y optimización simultánea de varias variables, con lo cual se obtuvo la combinación óptima de quitosano y glicerol para la obtención de las películas poliméricas.

El diseño experimental se lleva a cabo con procesos en los que se deben considerar diversas características (variables) para lograr productos con mejor calidad, mediante herramientas estadísticas, se optimizan simultáneamente todas las respuestas de interés.

Se fabricaron 45 muestras considerando las proporciones como baja (1%), media (4%) y alta (7%), las cuales se llevaron a una matriz experimental, en donde se llevó un orden de la cantidad de glicerol depositado para cada muestra, y en qué lugar del molde de teflón se depositaría.

A continuación se presentan las etapas llevadas a cabo para la fabricación de las películas poliméricas.

5.2.2. Etapa 1: Medición de glicerol orgánico. Para la elaboración de las películas poliméricas, así como para otorgar una textura elástica, se usaron como plastificantes, tres tipos de gliceroles, de origen vegetal, de grasa animal y de maíz.

La cantidad de glicerol a utilizarse se tomó en 3 proporciones distintas al 1%, al 4% y al 7%. Teniendo en cuenta que el molde en el cual se depositaron las mezclas tiene un espesor de 5 mm, y la cantidad de mezcla que allí será disuelta es de 12,70 ml, se procede a calcular la cantidad de glicerol a implementarse para cada una de las proporciones (1%, 4% y 7%). Para calcular la cantidad de glicerol dependiendo la proporción baja (1%), media (4%) o alta (7%), se implementa la siguiente ecuación matemática:

$$\% \frac{V}{V} = \frac{\text{Soluto}}{\text{Disolucion}} \times 100\% \rightarrow \frac{\text{Glicerol}}{\text{Quitano diluido}} \times 100 = X\% \quad [1]$$

Utilizando la Ecuación 1, se obtuvo la cantidad de glicerol implementada para las proporciones al 1%, 4% y 7%, en la tabla (tabla 4), se observa la cantidad destinada para cada una de las mezclas.

Las tres distintas proporciones de glicerol se consideran con el fin de obtener la mezcla más óptima, además observar cuál de estas brinda la mejor flexibilidad y la mejor resistencia a las películas a partir del tipo de glicerol y de la proporción utilizada.

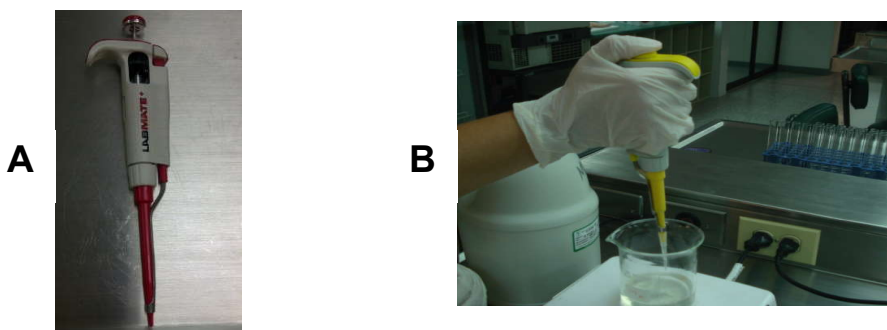
A continuación en el cuadro 4 se presentan las concentraciones de glicerol empleadas para la fabricación de las películas.

Cuadro 4: Concentraciones de glicerol utilizado

| Concentración (%) | Glicerol grasa animal (ml) | Glicerol vegetal (ml) | Glicerol de maíz (ml) |
|-------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 0,127 | 0,127 | 0,127 |
| 4 | 0,508 | 0,508 | 0,508 |
| 7 | 0,889 | 0,889 | 0,889 |

En la Figura 1, se muestran los equipos utilizados para la medición del glicerol empleado para la fabricación de las películas poliméricas.

Figura 1: Equipo utilizado para medir las proporciones de glicerol utilizadas “micropipeta” (A), Deposito de proporciones de glicerol en recipientes (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.3. Etapa 2: Medición de quitosano. El quitosano empleado viene en una presentación en polvo, marca ALDRICH chemistry de origen Irlandés, por cantidad de 100 g. Para saber la cantidad necesaria de quitosano a emplear para fabricar las películas, se llevó a cabo el cálculo según la ecuación de proporción peso – volumen. Según el número de moldes que se tienen (24) cada uno con una capacidad de 12,70 ml. En este sentido se concluye que se debe obtener al final una cantidad de la mezcla equivalente a 304,8 ml con el fin de suplir la capacidad de los moldes de teflón. Para conocer la cantidad de Quitosano a utilizar se debe realizar la suposición inicial de trabajar con 304,8 ml de ácido acético así:

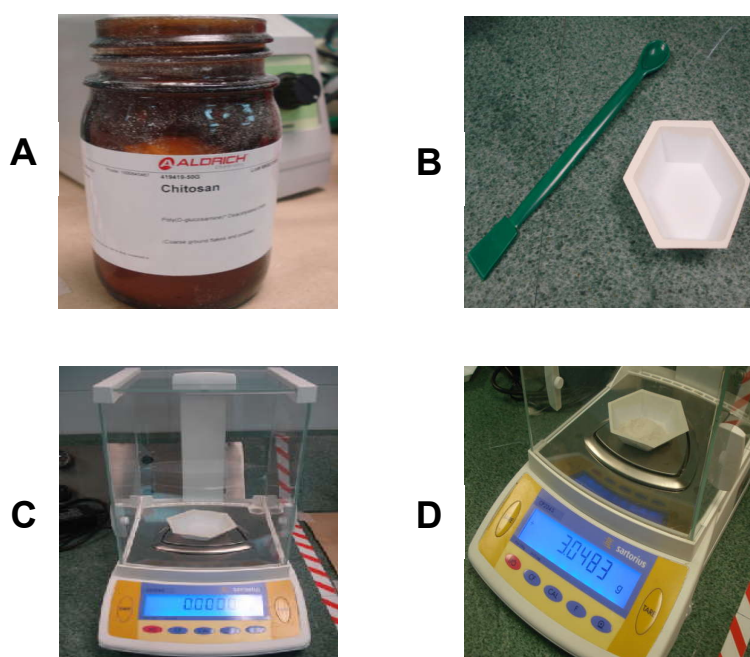
$$\% \frac{P}{V} = \frac{\text{Solute}}{\text{Disolución}} \times 100 \Rightarrow \frac{\text{Quitosano}}{\text{Ácido acético}} \times 100 \Rightarrow \frac{X [\text{gr}]}{304,8 [\text{ml}]} \times 100 = 1\% \quad [2]$$

Según la ecuación 2 para obtener una mezcla al 1% utilizando 304,8 ml de ácido acético se necesitan 3,048 g de quitosano.

Con la cantidad de quitosano a utilizarse ya calculada se procede a pesar la proporción necesaria obtenida a partir de la ecuación de proporción peso – volumen

En la Figura 2 se muestra el quitosano y los implementos empleados para el pesaje de dicho compuesto.

Figura 2: Quitosano utilizado (A), Paleta para tomar el polvo de quitosano y recipiente para depositarlo (B), Pesa con campana para medir el quitosano (C), cantidad exacta de quitosano obtenida a partir de los cálculos, observada en el indicador digital de la balanza (D), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

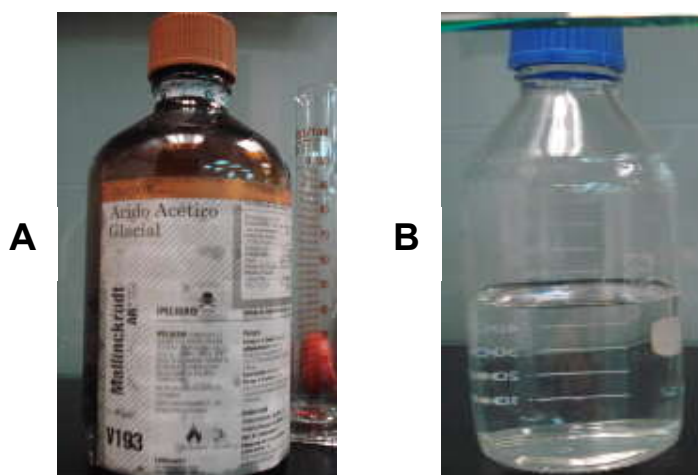


Para la fabricación de las películas, es necesario contar con que el quitosano se encuentre en forma líquida, para ello es necesario conseguir su disolución, la cual se lleva a cabo mezclando este con ácido acético a una concentración adecuada. A continuación se presenta la etapa en la cual se logra la disolución del quitosano.

5.2.4. Etapa 3: Preparación de ácido acético al 1%. Como reactivo inicial se usó ácido acético al 100%. Para la disolución del quitosano, se debe tener ácido acético al 1%, es por ello que fue necesario diluir el ácido acético en agua destilada para obtener así ácido acético al 1%.

En la Figura 3 se muestran los reactivos empleados para la obtención del ácido acético al 1%.

Figura 3: Ácido acético al 100% (A), agua destilada (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Para la obtención del ácido acético al 1%, se implementó la Ecuación 3 para tener conocimiento de la cantidad de agua destilada necesaria para disminuir el % de concentración del ácido de 100% a 1%.

$$\frac{1\% \times 500\text{ml}}{100\%} = 5\text{ml} \quad [3]$$

Se prepararon 500 ml de ácido acético al 1%, para estos 500 ml de ácido acético al 1% contamos con 5 ml de ácido acético al 100% y 495 ml de agua destilada.

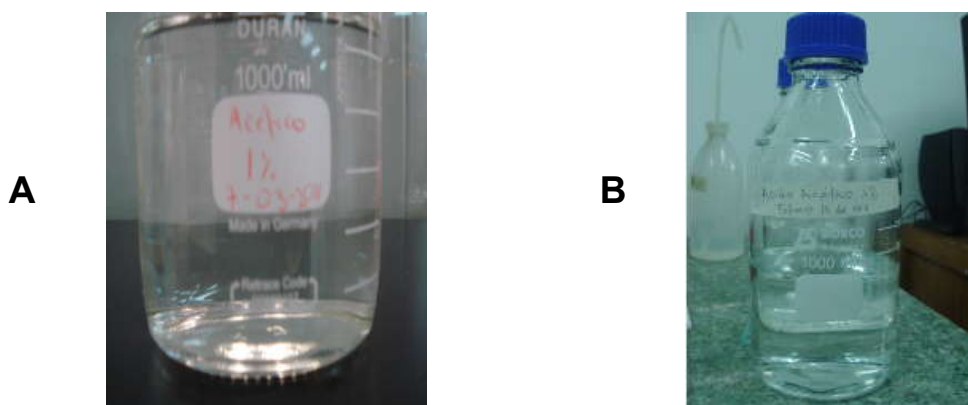
En el cuadro 5, se presentan los materiales, cantidades y concentraciones empleados para la obtención del ácido acético al 1 %.

Cuadro 5: Cantidad y concentración de los materiales empleados para la obtención del ácido acético al 1 %

| MATERIAL | CANTIDAD | CONCENTRACIÓN |
|-----------------------------|----------|---------------|
| Ácido acético | 5 ml | 100% |
| Agua destilada | 495 ml | - |
| Total ácido acético diluido | 500 ml | 1 % |

En la figura 4 se muestran las mezclas llevadas a cabo para la obtención del ácido acético al 1 %.

Figura 4: Baker mezcla de agua destilada y ácido acético al 100% (A) Ácido acético al 1% (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.5. Etapa 4: Disolución de quitosano. El polvo de quitosano, debe ser diluido, pues para la obtención de las películas se debe contar con materiales líquidos. Para ello se requiere la mezcla de los 3,048 gr, con los 500 ml de ácido acético al 1%.

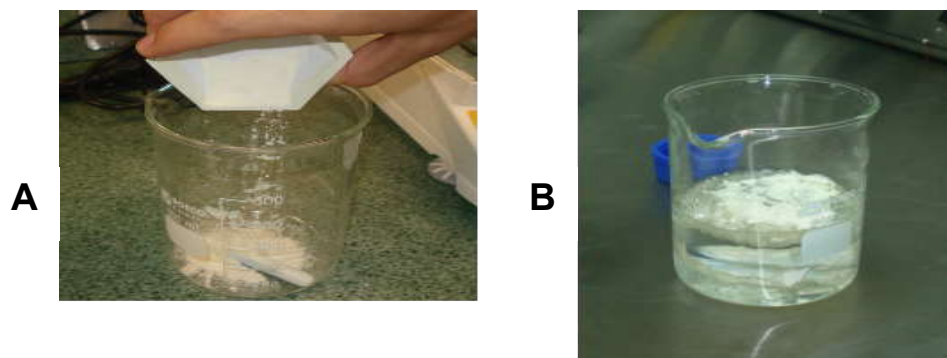
En el cuadro 6 se muestran las proporciones de los compuestos, ácido acético al 1 % y quitosano para la mezcla.

Cuadro 6: Proporción de ácido acético al 1 % y quitosano empleados para la preparación de la mezcla

| | Beaker 1 | Beaker 2 | Beaker 3 | Beaker 4 | Beaker 5 | Beaker 6 | Total |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
| Acido acético al 1 % | 83,300 mL | 83,300 mL | 83,300 mL | 83,300 mL | 83,300 mL | 83,300 mL | 500 mL |
| Quitosano | 0,508 g | 0,508 g | 0,508 g | 0,508 g | 0,508 g | 0,508 g | 3,048 g |

En la Figura 5 se muestran imágenes de los procedimientos llevados a cabo y los equipos utilizados para la disolución del quitosano.

Figura 5: Deposito de quitosano en Baker con agitador magnético (A), mezcla de ácido acético con quitosano (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Después de transcurridas 6 horas de agitación de la mezcla, se observa un líquido viscoso, lo que indica que la mezcla esta lista para el siguiente procedimiento.

En la Figura 6 se muestra el estado final del quitosano diluido en el ácido acético al 1 % transcurridas 6 horas de agitación.

Figura 6: Mezcla de quitosano y ácido acético después de transcurridas 6 horas de agitación (A), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.6. Etapa 5: Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico de maíz.

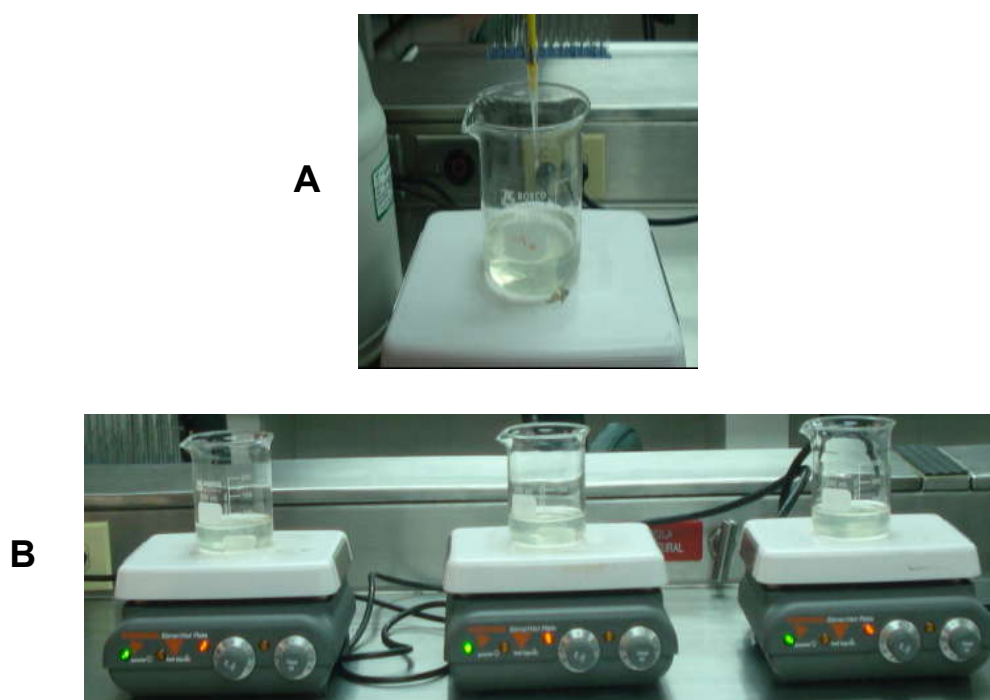
En el cuadro 7 se muestra la concentración de glicerol de maíz en sus tres proporciones baja, media y alta, y la concentración de quitosano diluido en ácido acético, empleados para la mezcla por un tiempo de 6 horas del polímero con el plastificante (quitosano y glicerol).

Cuadro 7: Proporciones de glicerol de maíz y quitosano diluido en ácido acético empleadas para la mezcla

| | Concentración baja de glicerol (1 %) | Concentración media de glicerol (4 %) | Concentración alta de glicerol (7 %) |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| MATERIALES | Beaker 1 | Beaker 2 | Beaker 3 |
| Quitosano diluido | 83,808 mL | 83,808 mL | 83,808 mL |
| Glicerol de maíz | 0,127 mL | 0,508 mL | 0,889 mL |

En la figura 7 se muestran las imágenes de los equipos y procesos llevados a cabo para la mezcla de glicerol de maíz y quitosano diluido.

Figura 7: Proceso para agregar glicerol a quitosano diluido “concentración glicerol de maíz alta” (A), muestras de quitosano y glicerol de maíz en las tres concentraciones en proceso de agitación (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.7. Etapa 6: Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico vegetal.

En el cuadro 8 se muestra la concentración de glicerol vegetal en sus tres proporciones baja, media y alta, y la concentración de quitosano diluido en ácido acético, empleados para la mezcla por un tiempo de 6 horas del polímero con el plastificante (quitosano y glicerol vegetal).

Cuadro 8: Proporciones de glicerol vegetal y quitosano diluido en ácido acético empleadas para la mezcla

| MATERIALES | Concentración baja de glicerol (1 %) | Concentración media de glicerol (4 %) | Concentración alta de glicerol (7 %) |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Quitosano diluido | 83,808 mL | 83,808 mL | 83,808 mL |
| Glicerol vegetal | 0,127 mL | 0,508 mL | 0,889 mL |

En la Figura 8 se muestran las imágenes de los equipos y procesos llevados a cabo para la mezcla de glicerol vegetal y quitosano diluido.

Figura 8: Mezcla de quitosano y glicerol de origen vegetal “concentración glicerol de origen vegetal alta” (A), muestras de quitosano y glicerol de origen vegetal en las tres concentraciones en proceso de agitación (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.8. Etapa 7: Mezcla de quitosano diluido con glicerol orgánico grasa animal. En el cuadro 9 se muestra la concentración de glicerol animal en sus tres proporciones baja, media y alta, y la concentración de quitosano diluido en

ácido acético, empleados para la mezcla por un tiempo de 6 horas del polímero con el plastificante (quitosano y glicerol animal).

Cuadro 9: Proporciones de glicerol animal y quitosano diluido en ácido acético empleadas para la mezcla

| | Concentración baja de glicerol (1 %) | Concentración media de glicerol (4 %) | Concentración alta de glicerol (7 %) |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| MATERIALES | Beaker 1 | Beaker 2 | Beaker 3 |
| Quitosano diluido | 83,808 mL | 83,808 mL | 83,808 mL |
| Glicerol animal | 0,127 mL | 0,508 mL | 0,889 mL |

En la figura 9 se muestran las imágenes de los equipos y procesos llevados a cabo para la mezcla de glicerol animal y quitosano diluido.

Figura 9: Mezcla de quitosano y glicerol de grasa animal “concentración glicerol de grasa animal alta” (A), muestras de quitosano y glicerol grasa animal en las tres concentraciones en proceso de agitación (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.9. Etapa 8: Depósito de mezclas en tubos de ensayo. Transcurridas las 2 ½ horas de agitación de cada uno de los tres tipos de glicerol en sus tres respectivas concentraciones (baja, media y alta), se pasó a envasar estas mezclas en tubos de ensayo. Para cada uno de las concentraciones se implementaron 5 tubos de ensayo. En cada tubo de ensayo se depositaron 12,7 ml de la mezcla.

En el cuadro 10 se muestra la distribución de la cantidad de la mezcla de glicerol y quitosano diluido en los 9 tubos de ensayo.

Cuadro 10: Distribución de la mezcla en tubos de ensayo

| Tipo de glicerol | Concentración | Proporción mezcla para cada tubo | Tubos implementados | Cantidad total de mezcla |
|-------------------------|----------------------|---|----------------------------|---------------------------------|
| Maíz | Baja | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Maíz | Media | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Maíz | Alta | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Vegetal | Baja | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Vegetal | Media | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Vegetal | Alta | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Animal | Baja | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Animal | Media | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |
| Animal | Alta | 12,7 ml | 5 | 63,5 ml |

Como se observa en casa uno de los tubos quedo 12,7 ml de cada tipo de glicerol en sus tres distintas concentraciones.

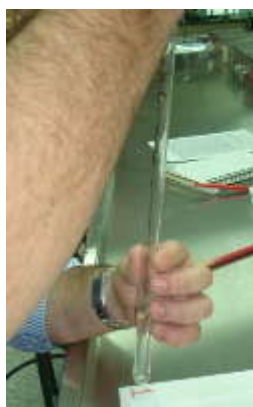
En la figura 10 se observan los equipos y el proceso llevado a cabo para la medición y el depósito de la mezcla de glicerol y quitosano diluido en los tubos de ensayo.

Figura 10: Medición con pipeta de 12,7 ml de cada tipo de glicerol en su diferente concentración para depósito en tubos de ensayo (A), depósito de mezclas en tubos de ensayo (B), tubos de ensayo con mezclas (C), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

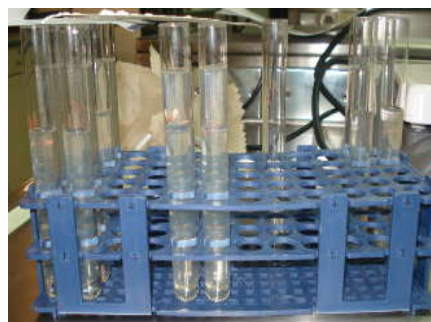
A



B



C



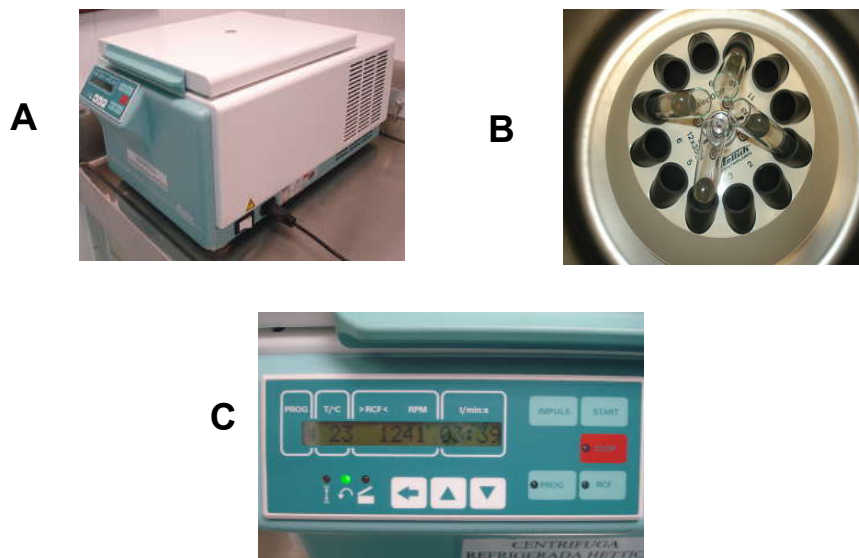
5.2.10. Etapa 9: Centrifugado de la mezcla. Posterior al depósito de las mezclas en los tubos de ensayo, se procede a ubicar estos en la centrifuga a una velocidad de 3500 RPM durante un tiempo aproximado de 8 minutos; este proceso se lleva a cabo con el fin de eliminar moléculas de aire que forman burbujas en la mezcla, lo cual puede ocasionar inconsistencias en la estructura de las películas al secarse.

Para cada proceso de centrifugación se emplearon 4 tubos de ensayo, ubicados de forma uniforme, tratando de equilibrar los pesos, para ello todos los tubos deben poseer el mismo nivel de mezcla.

El proceso de centrifugación fue llevado a cabo 11 veces, hasta que todas las mezclas depositadas en los tubos de ensayo fueran procesadas.

En la Figura 11 se muestra el equipo (centrifuga), y los parámetros establecidos en este equipo para el proceso de centrifugado de las muestras.

Figura 11: Centrifuga empleada para dicho proceso (A), ubicación de los tubos de ensayo en la centrifuga (B), parámetros establecidos y proceso de centrifugado (C), centrifuga refrigerada universal 32 R, laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

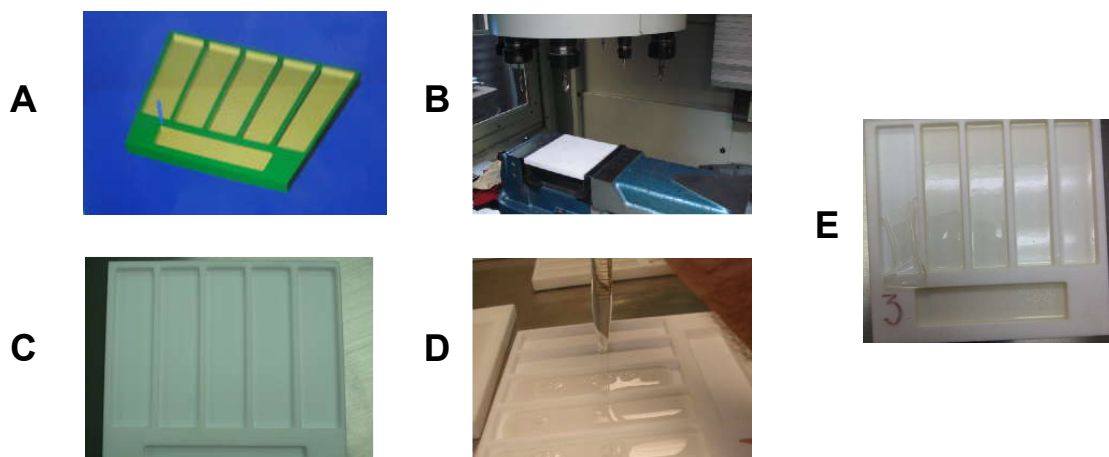


5.2.11. Etapa 10: depósito de mezcla en moldes de teflón. Finalizado el proceso de centrifugado de la mezcla, procedemos a depositar el contenido de los tubos de ensayo en los moldes de teflón. Estos moldes de teflón fueron obtenidos a partir de un proceso de maquinado, llevado a cabo en el laboratorio de manufactura de la Universidad Autónoma de Occidente, las medidas establecidas para dichos moldes tienen un área de 100 mm de largo y 20 mm de ancho las cuáles son las proporcionadas para llevar a cabo pruebas con materiales poliméricos.

Los moldes de teflón, deben ser lavados y secados al aire, no debe secarse con paños, papel o algún tipo de material que pueda dejar residuos ocasionando inconsistencias en la mezcla. La mezcla se vertió de manera homogénea sobre el molde logrando así que esta quede esparcida por toda la superficie.

En la Figura 12 se muestra el modelo CAD, el proceso de maquinado del teflón y los moldes de teflón obtenidos después del maquinado según las medidas especificadas.

Figura 12: Modelo CAD de los moldes a obtenerse (A), Maquinado de teflón para obtención de moldes (B), Moldes de teflón (C), Deposito de la mezcla en moldes de teflón (D), Mezcla depositada (E), laboratorio de Ciencias Biomédicas y Laboratorio de Proceso de Manufactura de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.12. Etapa 11: Cubrimiento de mezcla con campana de acrílico. Ya depositadas las mezclas en los moldes de teflón, se procede a cubrir estas con una campana de acrílico. Para ello se ubican los moldes con la mezcla en el lugar destinado para estas, evitando así que estas sean movidas, estas son ubicadas en un lugar con temperatura promedio de la temperatura ambiente (24°C). Cubrir las mezclas con la campana evita que impurezas caigan sobre estas además de mantener una humedad relativa e del 60 % en el lugar.

En la Figura 13 se observa la campana de acrílico con la cual fueron cubiertas las muestras, para evitar así el paso de impurezas a estas y para el control de la humedad.

Figura 13: Cubrimiento de los moldes con la campana de acrílico (A), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

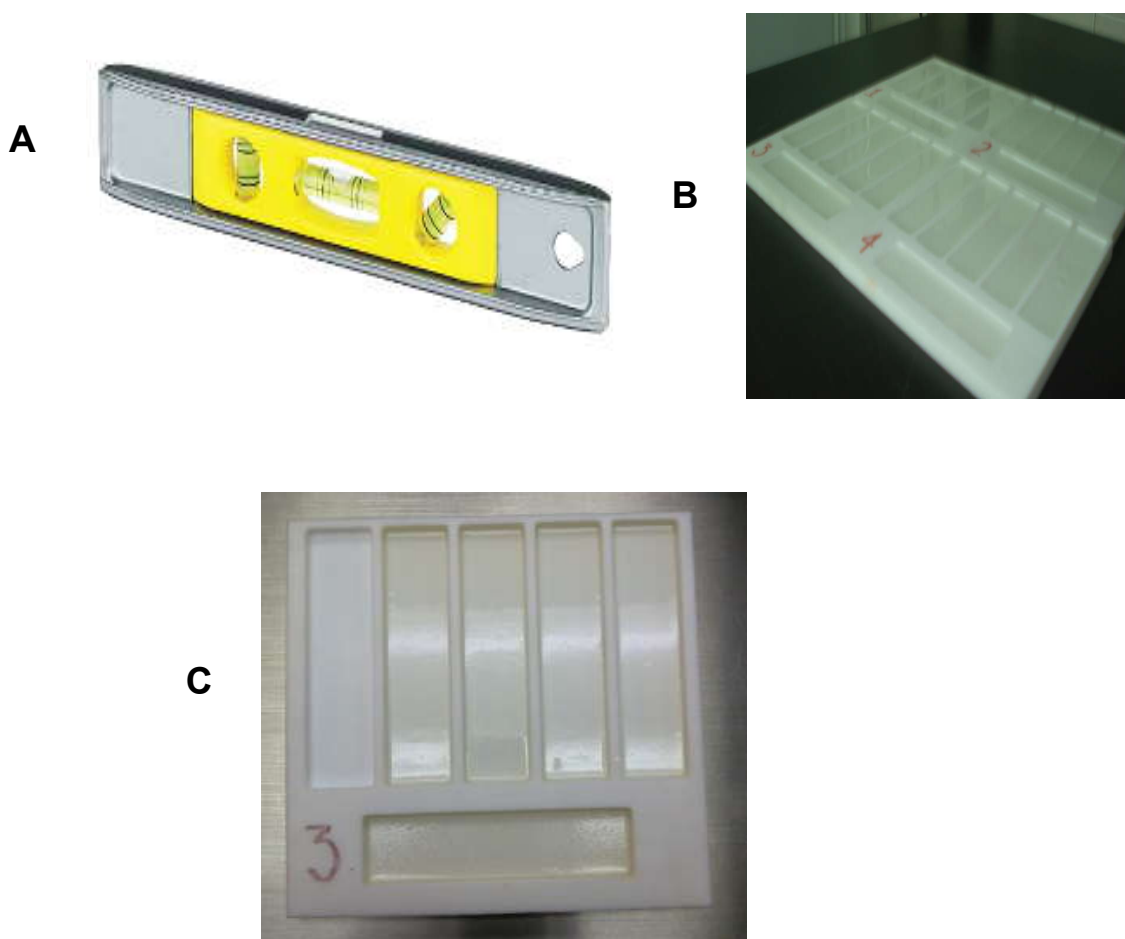


5.2.13. Etapa 12: Evaporación de mezcla a temperatura ambiente.

Cubiertas ya las mezclas con la campana de acrílico, se dejan estas allí a temperatura ambiente con humedad relativa del 60%, durante un tiempo establecido de 96 horas aproximadamente. Las mezclas no deben ser movidas del lugar en el cual fueron ubicadas inicialmente, no se debe retirar la cubierta de acrílico en ningún momento antes de transcurrido el tiempo ya establecido, además de tener en cuenta que estas deben ser niveladas al momento en el cual se ubican en el lugar que se establezca, esto debe hacerse con ayuda de un medidor de nivel, logrando que estas queden a un mismo nivel para no ocasionar alteraciones en la estructura del producto que se obtendrá.

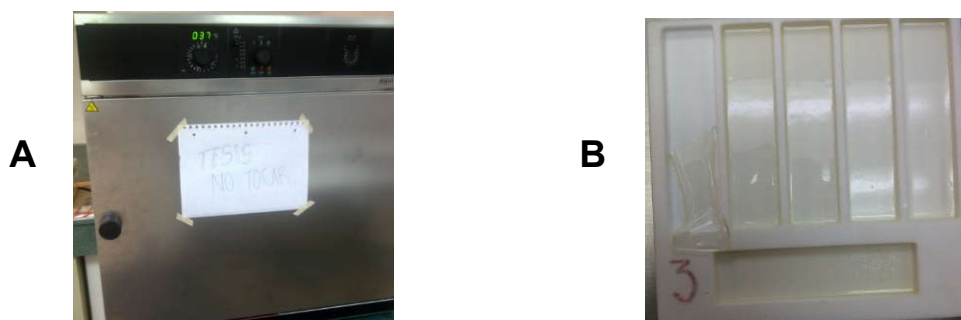
En la Figura 14, se muestra el dispositivo empleado para nivelar las muestras, se observan también la forma en la cual quedaron ubicadas las muestras en el lugar de reposo.

Figura 14: Nivelador (A), Ubicación de los moldes con las mezclas (B), Estado de las mezclas después de transcurrido el tiempo establecido (C), laboratorio de Ciencias Biomédicas y Laboratorio de Proceso de Manufactura de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.2.14. Etapa 13: Secado de la mezcla a 40°C. Transcurridas 96 horas de secado a temperatura ambiente de las mezclas en los moldes de teflón, se procede a ubicar los moldes con las mezclas en un horno a una temperatura de 40° C por un tiempo aproximado de 48 horas. Con esta temperatura se logra que finalmente la mezcla culmine con su periodo de evaporación, obteniéndose así un material uniforme similar a un plástico conocidas con el nombre de películas poliméricas.

Figura 15: Horno (A), Estado de las mezclas después de transcurridas 46 horas en el horno a 40 °C (C), Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

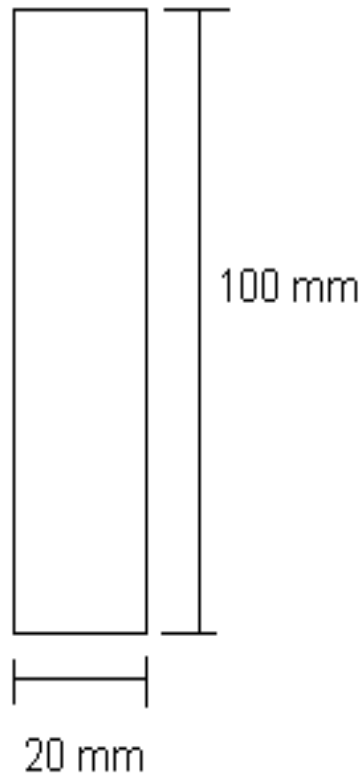


5.3. PRUEBAS DE RESISTENCIA MECÁNICA PARA ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODO DE OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS CON LAS CARACTERÍSTICAS ADECUADAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Para la determinación de las propiedades mecánicas de las películas se utilizó la norma o método estándar para pruebas de tracción de plásticos ASTM D 882-10. Esta norma aporta la información necesaria para el análisis correcto. Esta información incluye medida requerida para las probetas, la forma de las probetas, características ambientales adecuadas para llevar a cabo las pruebas, el método a utilizar y la distancia inicial de los grips o mordazas de la máquina universal INSTRON.

La norma ASTM D 882-10 determina que las probetas deben ser de forma rectangular con 100 mm de largo por 20 mm de ancho. En la Figura 16 se muestra el área establecida por la norma ASTM D 882-10 para polímeros.

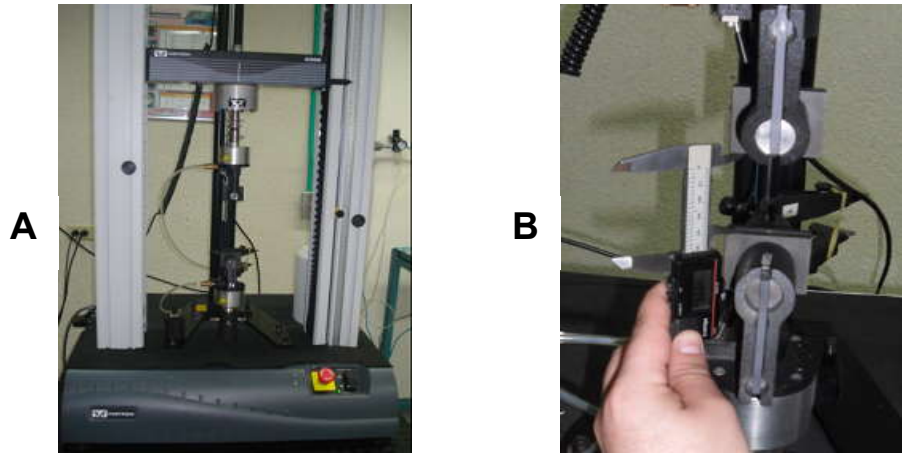
Figura 16: Área establecida por la norma ASTM D882-10 para pruebas de resistencia mecánica en polímeros.



Con la información proporcionada por la norma, se procede a la preparación de los equipos necesarios para las pruebas de resistencia mecánica. Para ello se toma una medida inicial de los grips o mordazas de la máquina universal INSTRON que es de aproximadamente 50 mm entre grip y grip.

En la Figura 17 se observa la máquina universal de ensayos INSTRON que fue empleada para realizar las pruebas de resistencia mecánica a las películas poliméricas, también se muestra la ubicación de la película en los grips de la máquina.

Figura 17: Maquina universal de ensayos INSTRON (A), Distancia entre grips de la maquina universal INSTRON 3066 (B), laboratorio de Materiales de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Ya establecida la distancia entre los grips de la maquina universal INSTRON, se toman las películas poliméricas y se deja un espacio libre en estas de 50 mm, divididos 25 mm en cada extremo de la película los cuales van ubicados en cada grip.

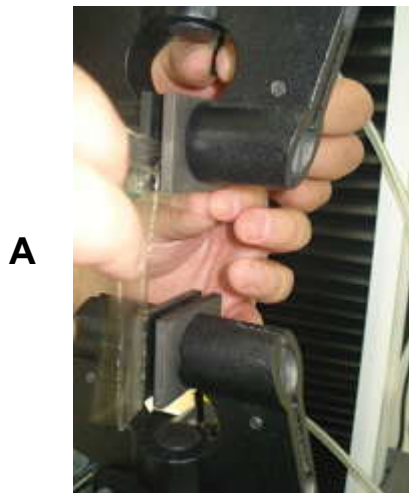
En la Figura 18 se observa la medida de la película polimérica obtenida, así como la distancia que sujetan los grips de la maquina universal de ensayos INSTRON los extremos de la película, para llevarse a cabo las pruebas.

Figura 18: Bosquejo de película polimérica obtenida para las pruebas de resistencia mecánica.



En la Figura 19 se puede observar la ubicación adecuada de las películas en la maquina universal INSTRON para las pruebas de resistencia mecánica.

Figura 19: Ubicación de la película polimérica en la maquina universal INSTRON 3366 (A), laboratorio de Materiales de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Con la película ya ubicada de forma adecuada en la maquina universal INSTRON, se establece una velocidad de 50 mm/min y una frecuencia de datos de 10 puntos por segundo que se van a tomar, con el transcurso del proceso. Estos puntos de muestreo arrojan las graficas de esfuerzo con respecto a la deformación de las películas. Este software también arroja una tabla que contiene la carga máxima (KN), deformación porcentual en la carga máxima (%), tensión en la carga máxima (MPa), módulo de Young (Mpa) y deformación en la carga máxima (mm/mm).

En la Figura 20 se muestra el equipo para el establecimiento de los parámetros para la toma de datos durante la prueba para determinación de resistencia mecánica de las películas.

Figura 20: Proceso para determinación de propiedades mecánicas de la película polimérica (A), laboratorio de Materiales de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

A



5.4. ENCAPSULAMIENTO DEL DIÓXIDO DE SILICIO EN LA MATRIZ POLIMÉRICA QUE PRESENTÓ LAS MEJORES CARACTERÍSTICAS DE RESISTENCIA MECÁNICA

Obtenida la mezcla óptima de quitosano – glicerol, se procedió a hacer cinco replicas de dicha combinación. Para la fabricación de estas cinco replicas, fue necesario repetir el proceso establecido inicialmente para la obtención de las películas poliméricas. Transcurrido el tiempo de mezcla del quitosano con el glicerol, se añadió a la mezcla 0,38 g de dióxido de silicio (equivalente al 0,5% de la mezcla) el cual tiene un tamaño de partícula de 12 nanómetros. La proporción adecuada del dióxido de silicio se obtuvo utilizando la Ecuación 4.

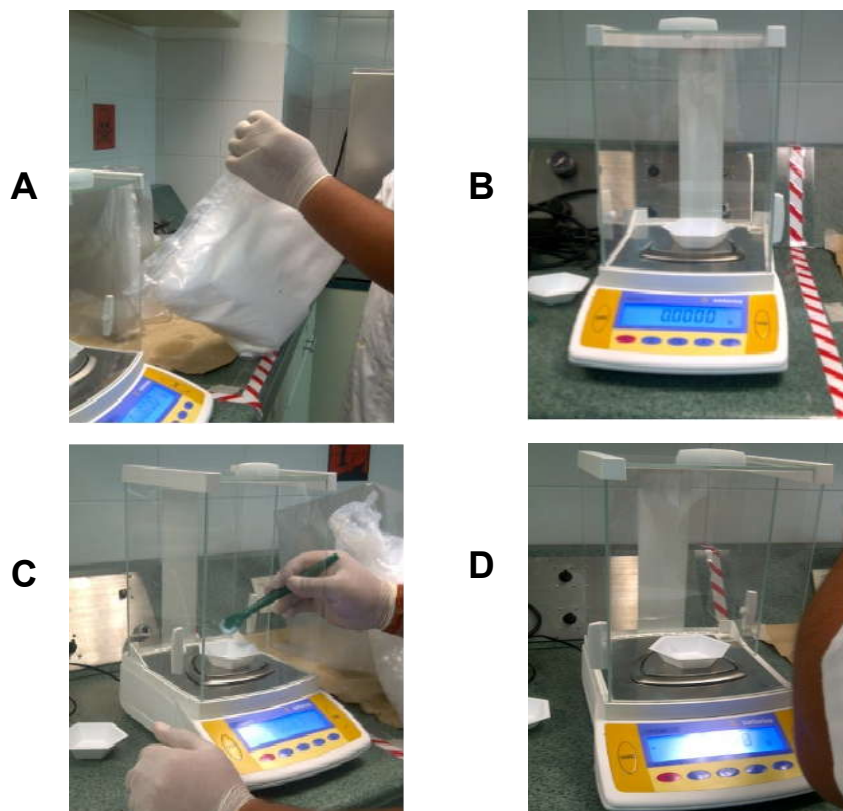
$$\frac{X [gr]}{75,64 [ml]} \times 100 = 0,5\%$$

[4]

Para el pesaje y la manipulación del dióxido de silicio, fue necesario tener en cuenta el Material Safety Data Sheet (MSDS) de este componente.

En la Figura 21 se observa el proceso llevado a cabo para el pesaje de 0,38 g de dióxido de silicio, para ser depositados a la mezcla.

Figura 21: Manipulación del dióxido de silicio (A), Calibración de la balanza de precisión (B), Deposito del dióxido de silicio en la balanza (C), Peso del dióxido de silicio (D), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Adicionado el dióxido de silicio a la solución de quitosano y glicerol, se continúa con la agitación por un tiempo prolongado de 3 horas. Transcurrido el tiempo de agitación, se retiraron las mezclas del agitador y se procedió a depositar estas en tubos de ensayo para llevar a cabo el proceso de centrifugado, repitiendo el mismo ciclo mencionado en la fabricación inicial de las películas.

En la Figura 22 se muestra el proceso de mezclado del dióxido de silicio con la disolución (quitosano - glicerol).

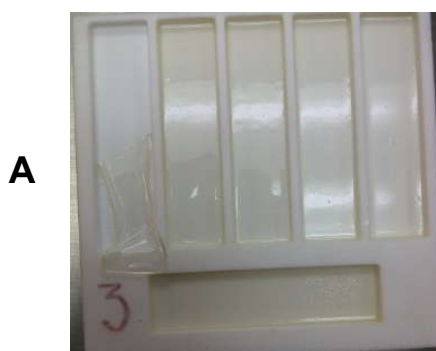
FIGURA 22: Agitación de la mezcla de quitosano, glicerol y dióxido de silicio (A), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Ya centrifugadas las mezclas, se vierten en los moldes de teflón, se cubren con la campana acrílica y se repite el método de evaporación lenta ya mencionado y trabajado anteriormente en el proceso de la fabricación de las películas.

En la Figura 23 se muestran las películas poliméricas obtenidas a partir de la mezcla de quitosano y glicerol con dióxido de silicio encapsulado.

Figura 23: Películas de quitosano, glicerol y dióxido de silicio encapsulado (A), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.5. TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO CITOTÓXICO

5.5.1. Viabilidad celular. Esta es una prueba experimental de respuesta inmediata en corto tiempo que usa azul de *tripán* como medio de tinción; de este modo se mide la biocompatibilidad de los materiales a través del seguimiento del comportamiento de las células (linfocitos) al ser expuestas a dichos materiales durante un periodo de 3 días consecutivos. Se evalúan aspectos que relacionan la membrana citoplasmática en cuanto a su rompimiento y cambio de morfología en el momento en que el colorante penetra la célula, para luego determinar índices de viabilidad celular^{30,31}.

Para llevar a cabo el procedimiento para determinación de viabilidad celular, fue necesaria la extracción de sangre por venopunción, por lo cual fue indispensable contar con pacientes y para ello se tiene un consentimiento informado que se encuentra en el anexo C, el cual debe ser diligenciado cuando se llevan a cabo pruebas e investigaciones con seres humanos.

Para tener una mayor claridad del procedimiento llevado a cabo para las pruebas de determinación de viabilidad celular puede observarse el anexo D, en el cual se encuentra consignado de forma detallada el protocolo experimental.

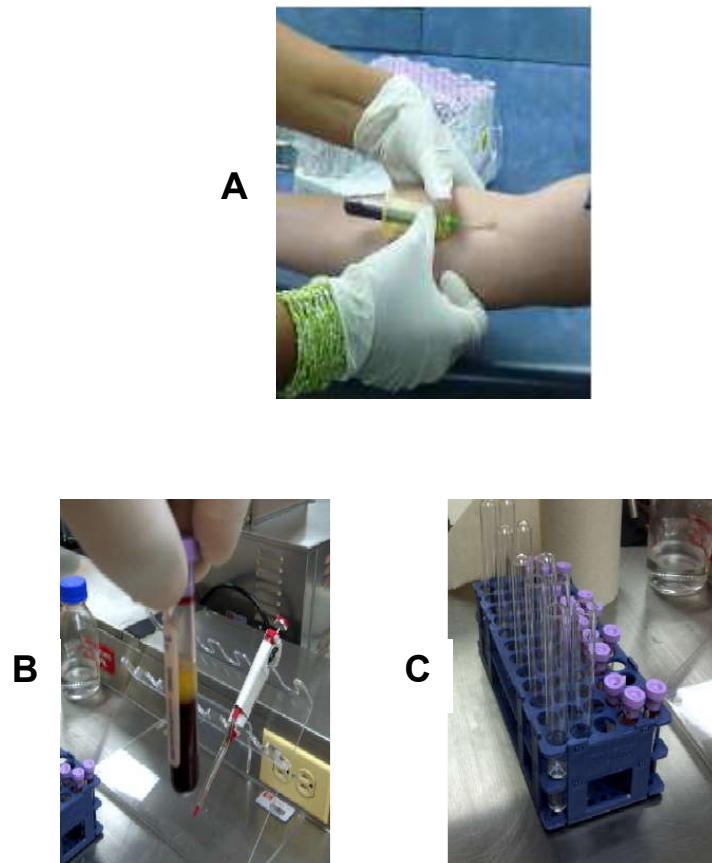
El análisis de citotoxicidad se realizó para 5 muestras, tomando un material biocompatible como control positivo, 3 películas poliméricas con diferentes concentraciones de dióxido de silicio y un material no biocompatible que se utilizó como control negativo (caucho). Estos controles tanto positivo como negativo se utilizan como punto de referencia para el análisis y la comparación de los resultados.

En la Figura 24 se muestra el procedimiento llevado a cabo para la extracción de la sangre, con la cual se llevó a cabo el procedimiento para la determinación de viabilidad celular de las películas.

³⁰ GALEANO, A., GUTIÉRREZ T., Estandarización de dos técnicas para evaluar actividad y viabilidad celular *in vitro* en respuesta a biomateriales. Tesis. Universidad Autónoma de Occidente. 2009.

³¹ LERMA FABIAN., PLAZAS GERMAN., diseño de una monocapa para recubrimientos con material W-DLC y Si-DLC en aplicaciones biomédicas. Tesis. Universidad Autónoma de Occidente. 2010.

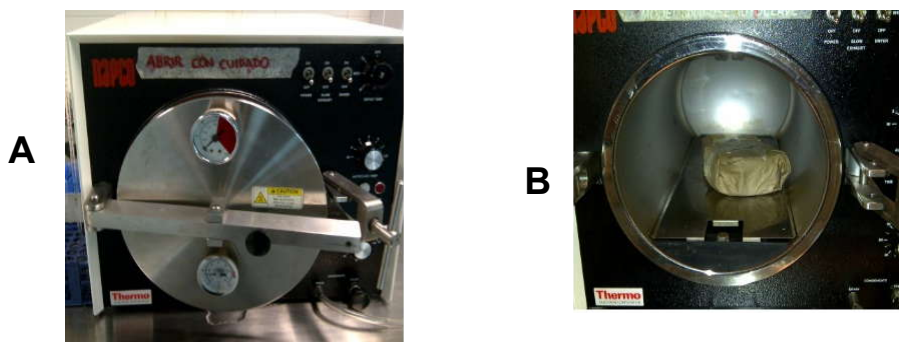
Figura 24: Extracción de sangre por venopuncion (A), tubo con sangre (B), tubos con sangre de los distintos pacientes (C), extracción de sangre por venopunción, Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



Para llevar a cabo el procedimiento para la determinación de viabilidad celular, deben ser esterilizados los implementos a utilizarse en la autoclave.

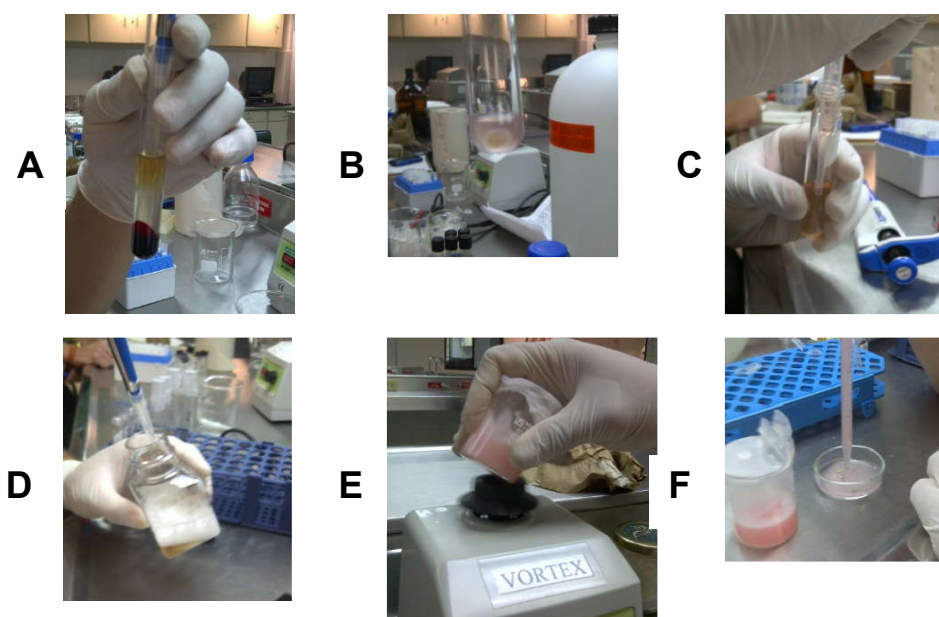
En la Figura 25, se observa el equipo utilizado para la esterilización de los implementos empleados para el proceso de determinación de viabilidad celular.

Figura 25: Autoclave (A), implementos en proceso de esterilización (B), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



En la Figura 26, se muestran algunas imágenes del proceso llevado a cabo para la determinación de la viabilidad celular, mediante pruebas de citotoxicidad a través del cultivo de linfocitos.

Figura 26: Sangre centrifugada (A), separación de cadena de linfocitos (B), tubo de ensayo después de lavado de linfocitos (C), preparación del antibiótico (penicilina y gentamicina) (D), Mezcla de linfocitos, antibiótico y RPMI (E), Deposito de la película polimérica en la mezcla de linfocitos, antibiótico y RPMI (F), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



5.6. PRUEBAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS (SEM)

Obtenida ya la matriz polimérica con el dióxido de silicio encapsulado, se procedió a realizar pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido, para la cual se utilizó el Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV del Laboratorio de la Escuela de Materiales de la Universidad del Valle. Estas pruebas se llevaron a cabo con el fin de determinar la homogeneidad y porosidad de las películas.

La técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), es una técnica que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él, se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con la utilización de esta técnica, se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas³².

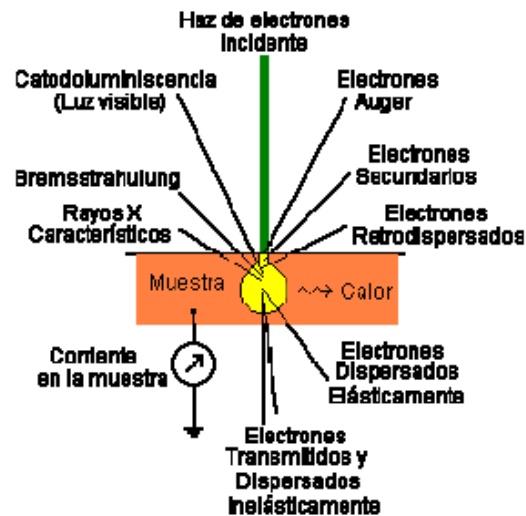
La imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra³³.

En la Figura 27, puede observarse el principio de funcionamiento según los componentes del Microscopio Electrónico de Barrido.

³² ZEGARRA, M. MONTESINOS, S. Trabajo de tesis, aplicaciones de microscopia electronica de barrido (sem) y analisis de fractura de una aleación de cu– 10 a1, Universidad de Chile, 2009.

³³ ORTÍZ, A. BRIANO, M. GALVÁN, R. Tesis, El microscopio electrónico de barrido un instrumento útil para la ciencia, Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2010.

Figura 27: Principio de funcionamiento del SEM, según componentes.



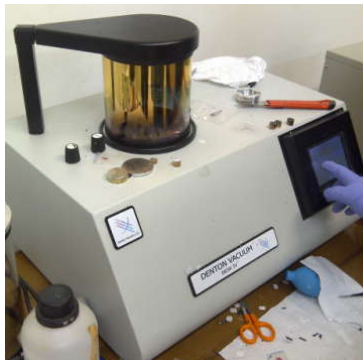
Fuente: http://www.mty.itesm.mx/dia/deptos/im/m00-862/Lecturas/SEM_ICP.pdf

5.6.1. Preparación de las muestras. Para llevar a cabo las pruebas de Microscopia de Barrido Electrónico, fue necesario recubrir con una o varias capas de oro a las películas poliméricas, ya que los polímeros no son materiales conductores por lo cual los electrones no pueden moverse a través de estos.

Este proceso se realizó en una cámara de vacío Denton Vacuum, la cual calienta el oro a altas temperaturas hasta evaporarse, logrando así que las películas poliméricas sean recubiertas por este material.

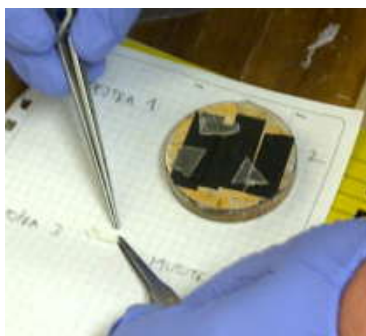
En la Figura 28 puede observarse el equipo empleado para llevar a cabo el recubrimiento de las películas poliméricas con oro.

Figura 28: Cámara de Vacio Denton Vacuum, Laboratorio Escuela de Materiales, Universidad del Valle.



Las muestras fueron ubicadas sobre una probeta, para así ser llevadas a la Cámara de Vacio donde se realizó el proceso de recubrimiento con oro. En la Figura 29 se presentan las muestras listas para ser recubiertas.

Figura 29: Muestras de películas poliméricas listas para ser introducidas a la Cámara de Vacio Denton Vacuum para el proceso de recubrimiento con oro, laboratorio Escuela de Materiales, Universidad del Valle.



Finalmente fueron introducidas las muestras en la cámara de vacío Denton Vacuum, para ser recubiertas con oro. Este proceso tiene una duración de aproximadamente 15 minutos.

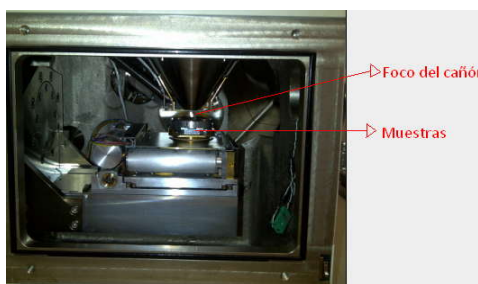
5.6.2. Proceso llevado a cabo para las pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido a las películas poliméricas. Posterior al recubrimiento de las muestras con las capas de oro, estas fueron llevadas al Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6490LV. En la Figura 30, se muestra el Microscopio Electrónico de Barrido empleado para las pruebas.

Figura 30: Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6490LV, Laboratorio Escuela de Materiales, Universidad del Valle.



Las películas fueron colocadas en el interior del Microscopio Electrónico de Barrido a una distancia de 1 cm del foco del cañón, para llevar a cabo así un buen análisis de la muestra y obtener las imágenes adecuadas. En la Figura 31, puede observarse la ubicación de la muestra en el interior del Microscopio Electrónico de Barrido

Figura 31: Ubicación de las muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6490LV, laboratorio Escuela de Materiales, Universidad del Valle.



Introducidas las muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido, se corrobora que la distancia entre las muestras y el foco del cañón sea la adecuada, se procede a cerrar la cámara donde se ubicaron estas y se lleva a cabo un proceso de vacío. Terminado el vacío en la Cámara del Microscopio, se configuran los parámetros respectivos para la visualización que se desee, así como la potencia del equipo la cual da la resolución de las imágenes obtenidas.

Establecidos así los parámetros del Microscopio Electrónico de Barrido, se inicia con el proceso para la toma de imágenes microscópicas de las películas poliméricas de quitosano, glicerol de maíz en alta concentración y dióxido de silicio en sus tres concentraciones baja, media y alta.

6. ANÁLISIS Y RESULTADOS

6.1. OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS

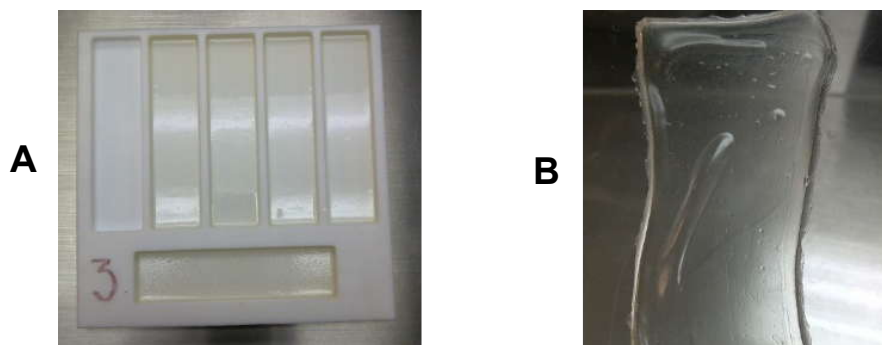
6.1.1. Obtención de quitosano líquido. Transcurridas seis horas de agitación de la mezcla quitosano – ácido acético se observó una disolución total del quitosano, obteniendo así un líquido viscoso y homogéneo.

6.1.2. Obtención de soluto a partir de quitosano diluido y glicerol. Una vez depositado el glicerol a la mezcla y transcurridas dos horas de agitación, se obtuvo una mezcla con una mayor viscosidad, sin embargo se observan partículas de aire en la mezcla, las cuales se eliminaron mediante un proceso de centrifugado de la solución.

6.1.3. Obtención de películas poliméricas de quitosano y glicerol, a través del método de evaporación lenta. Transcurrido el segundo día posterior al depósito de la mezcla en los moldes de teflón, se observa una disminución en el volumen inicial del compuesto, de más o menos 1 mm³. Al cuarto día se observó una composición más rígida y una disminución considerable en su volumen. Culminado el tiempo de reposo a temperatura ambiente, y posterior a ser expuestas a una temperatura controlada de 40 °C, se observa un secado total de la mezcla, teniendo como resultado una película de aproximadamente 100 micrómetros de espesor y su comportamiento y apariencia similar a la de un plástico.

En la Figura 32, se muestran las películas poliméricas de quitosano y glicerol obtenidas a través del método de evaporación lenta transcurrido el tiempo de secado a temperatura ambiente y a 40 °C.

Figura 32: Películas poliméricas transcurrido el tiempo de secado (A), Película polimérica obtenida (B). Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.



6.2. RESULTADOS DISEÑO EXPERIMENTAL

Partiendo del desarrollo del diseño experimental mediante diseño factorial 3^2 superficies de respuesta y optimización simultánea de varias variables, se obtuvo las cantidades óptimas de los reactivos que componen las películas poliméricas. Se llevó a cabo el análisis de las propiedades mecánicas de 45 muestras, teniendo así que la concentración y el tipo adecuado de plastificante, es el glicerol de maíz en alta concentración (7%), equivalente a 0,889 mL, el cual es agregado a la proporción de quitosano diluido equivalente a 83,808 mL.

Gracias a la deformación obtenida para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz en alta concentración, se determinó a través de un gráfico de contorno de humedad Vs concentración la cantidad óptima de glicerol (plastificante), para la fabricación de las películas con una alta deformación.

En la figura 33 se observa el gráfico de contorno de humedad Vs concentración para la película polimérica que obtuvo la deformación más alta (311,667%).

Figura 33: Gráficos de contorno humedad Vs concentración para obtener cantidad optima de glicerol a utilizar para la fabricación de películas poliméricas con alta deformación.

GRÁFICO DE CONTORNO PARA DEFORMACIÓN PORCENTUAL (TIPO GLICEROL 1)

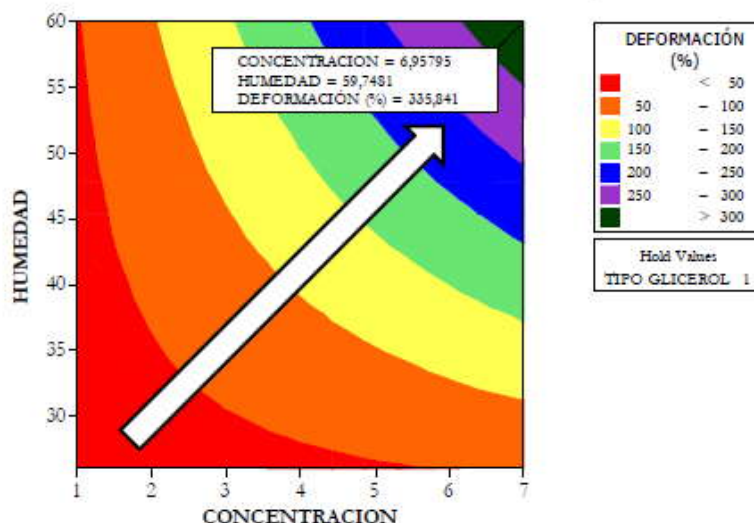
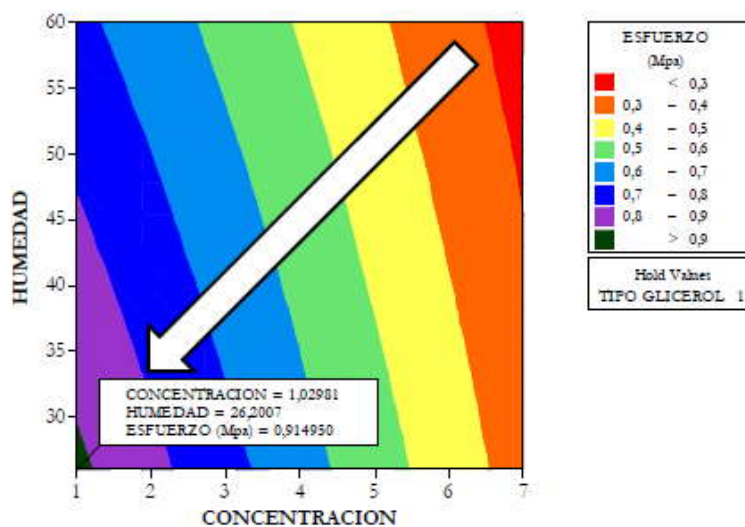


GRÁFICO DE CONTORNO PARA ESFUERZO (TIPO GLICEROL 1)



Como se observa en la figura 33, se tiene que con una humedad de aproximadamente 60% y una deformación aproximada a 312% la obtenida por las pruebas de resistencia mecánica de la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz en alta concentración, que la concentración de glicerol optima

para obtener esta deformación a esta humedad es de 6,96 aproximadamente 7%. Gracias a estos gráficos de contorno se pudo determinar la concentración de glicerol apropiado para la receta de la fabricación de las películas poliméricas que fue de 7% (0,889 mL).

En el cuadro 11, se muestra la receta o las concentraciones optimas obtenida a partir del desarrollo del diseño experimental.

Cuadro 11: Receta o concentraciones adecuadas para la fabricación de las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz, obtenidas a partir del desarrollo del diseño experimental

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Temperatura | 24°C ± 3°C |
| Humedad relativa | 60% ± 5% |
| Quitosano | 3,048 g |
| Tipo de Glicerol | Maíz |
| Concentración glicerol | 0,889 mL |
| Tiempo de agitación quitosano | 6 horas |
| Velocidad agitación quitosano | 7000 RPM |
| Tiempo agitación glicerol | 2 horas |
| Velocidad agitación glicerol | 7000 RPM |
| Velocidad centrifugado del compuesto | 3500 RPM |
| Tiempo centrifugado | 8 minutos |
| Tiempo reposo de las películas | 4 días |
| Tiempo secado al horno | 2 días |
| Temperatura del horno | 40°C |

Se puede observar en la Figura 34 las proporciones porcentuales obtenidas para los reactivos empleados en la fabricación de las películas poliméricas.

Figura 34: Proporciones porcentuales optimas de los reactivos empleados para la fabricación de las películas poliméricas.



Para la fabricación de una matriz polimérica basada en Quitosano y Glicerol en este caso de maíz en alta concentración, se obtuvo a partir del diseño experimental las proporciones porcentuales para los reactivos con los que se fabrican las películas poliméricas que se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12: Proporciones porcentuales óptimas de los reactivos empleados para la fabricación de las películas poliméricas

| Material | Concentración (mL) | Concentración (%) |
|-------------------------|--------------------|-------------------|
| Quitosano | 83,808 | 98,95 |
| Glicerol de Maíz (Alto) | 0,889 | 1,05 |

6.3. ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS

El proceso llevado a cabo para la determinación de las propiedades mecánicas de las películas poliméricas, se realizó en la maquina universal de ensayos INSTRON 6633, la cual arrojo datos de esfuerzo y deformación para cada una de las muestras con el glicerol en distintas concentraciones.

En el cuadro 13, se muestran los datos de esfuerzo y deformación obtenidos a través de un promedio de los datos arrojados para cinco 5 muestras. Los resultados que se presentan son: deformación porcentual (%) y tensión en la carga máxima (MPa) y los tratamientos incluyen la utilización a baja, mediana y alta proporción de los tres distintos glicerol usados.

Cuadro 13: Datos promedio de esfuerzo porcentual y deformación obtenidos para las películas poliméricas

| Muestras | Deformación promedio % en la carga máxima (%) | Tensión promedio en la carga máxima (MPa) |
|---|--|--|
| Quitosano – glicerol maíz bajo | 38,067 \pm 24 | 0,548 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol maíz medio | 110,556 \pm 24 | 0,128 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol maíz alto | 311,667 \pm 24 | 0,249 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol vegetal bajo | 37,033 \pm 24 | 0,505 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol vegetal medio | 104,000 \pm 24 | 0,151 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol vegetal alto | 257,333 \pm 24 | 0,179 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol grasa animal bajo | 37,961 \pm 24 | 0,141 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol grasa animal medio | 129,375 \pm 24 | 0,134 \pm 0,05 |
| Quitosano – glicerol grasa animal alto | 219,000 \pm 24 | 0,147 \pm 0,05 |

Se tiene así que la mejor deformación porcentual que es el dato que más interesa por las propiedades elásticas que presenta el material debido a la aplicación como apósito sobre la piel, por lo cual el material debe ser elástico y adaptarse a cualquier superficie del cuerpo humano, la presenta la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz en alta concentración.

En el cuadro 14 se muestran los datos obtenidos para las pruebas de tensión y deformación de las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz, y los datos de tensión y deformación obtenidos para películas poliméricas ya existentes.

Cuadro 14: Comparación entre datos de deformación y tensión obtenidas con las pruebas de resistencia mecánica de las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz con datos de deformación y tensión de películas poliméricas ya existentes

| Muestra | Deformación promedio en la carga máxima (%) | Tensión promedio en la carga máxima (MPa) |
|--------------------------------|--|--|
| Quitosano – glicerol maíz alto | 311,667 ± 24 | 0,249 ± 0,05 |
| Muestra | Deformación en la carga máxima (%) | Tensión en la carga máxima (MPa) |
| Quitosano – almidón | 150,000 ± 18,5 | 2,8 ± 0,3 |

La película de quitosano almidón, presenta una deformación de 150,000 ± 18,5% y una tensión de 2,8 ± 0,3 MPa ³⁴.

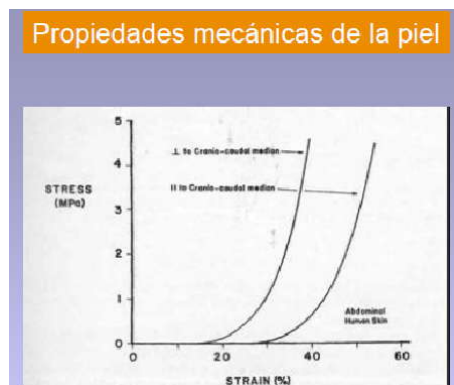
La deformación obtenida para la película de quitosano y glicerol de maíz es mayor a la obtenida para la película de quitosano y almidón.

Si se observan las características mecánicas de la piel se tiene que la deformación aproximada de esta es de 60 % y una tensión aproximada de 3 Mpa.

En la figura 35 se observa la curva de las propiedades mecánicas de la piel.

³⁴ Zarizky, M. Quitosano y almidón, películas poliméricas, Revista Centro de Investigación en criotecnología, Argentina, 2009.

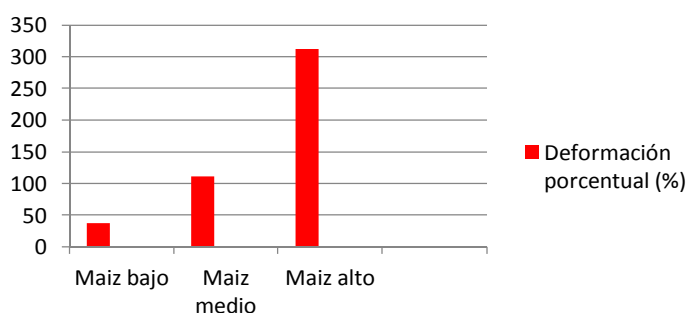
Figura 35: Curva de tensión Vs deformación para las pruebas de resistencia mecánica de la piel.



Mater, M, U.P.M, Propiedades mecánicas de la piel. Piel y membranas, España, 2009.

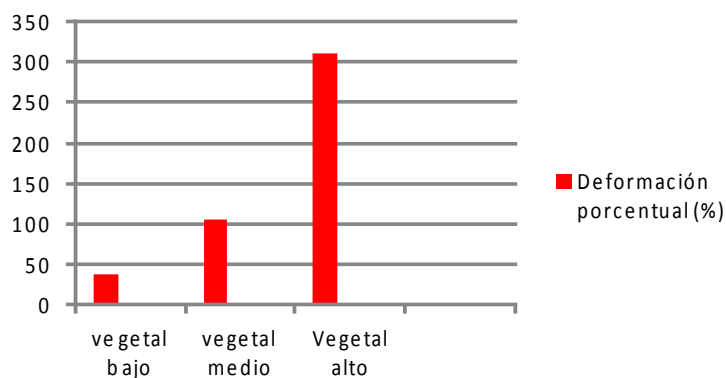
En la Figura 36 se muestra un histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz en sus tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 36: Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz en sus tres concentraciones (baja, media y alta).



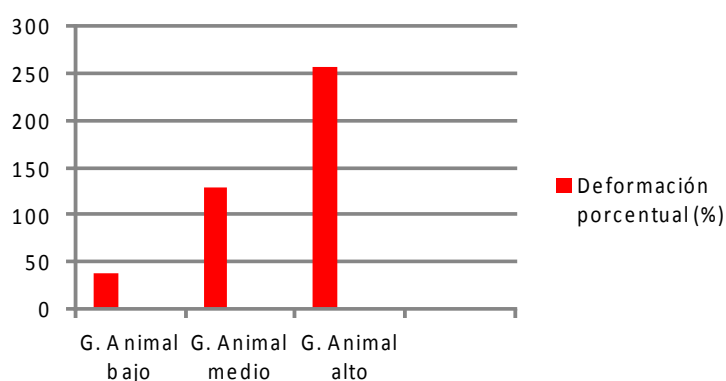
En la Figura 37 se muestra un histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol vegetal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 37: Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol vegetal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).



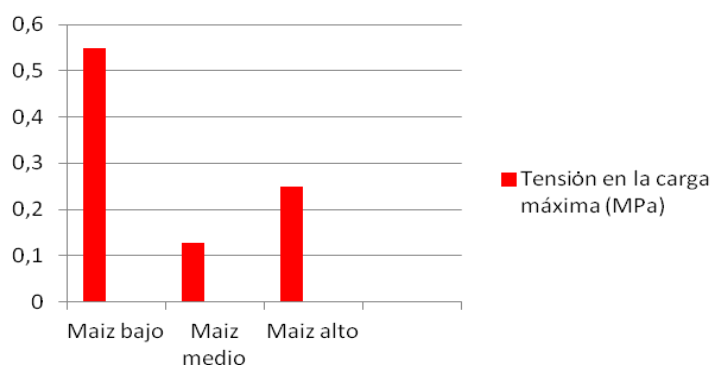
En la Figura 38 se muestra un histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol grasa animal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 38: Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de deformación a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol grasa animal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).



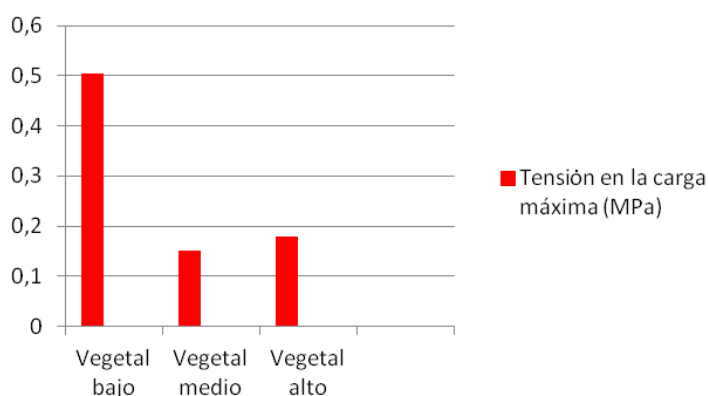
En la Figura 39 se muestra un histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz en sus tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 39: Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol de maíz en sus tres concentraciones (baja, media y alta).



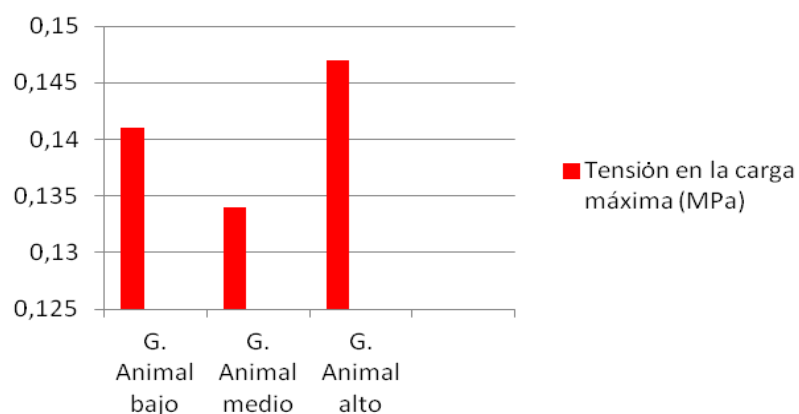
En la Figura 40 se muestra un histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol vegetal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 40: Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol vegetal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).



En la Figura 41 se muestra un histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol grasa animal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 41: Histograma de los 3 promedios obtenidos para las pruebas de tensión a las cuales fueron sometidas las películas poliméricas de quitosano y glicerol grasa animal en sus tres concentraciones (baja, media y alta).



Con los datos de deformación porcentual (%) y tensión en la carga máxima (MPa), se procede a graficar las curvas de esfuerzo vs deformación que pueden observarse en la Figura 42.

Figura 42: Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz bajo (A), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz medio (B), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz alto (C), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol vegetal bajo (D), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol vegetal medio (E), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol vegetal alto (F), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de grasa animal bajo (G), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de grasa animal medio (H), Gráfico de esfuerzo vs deformación para la película polimérica de quitosano y glicerol de grasa animal alto (I)

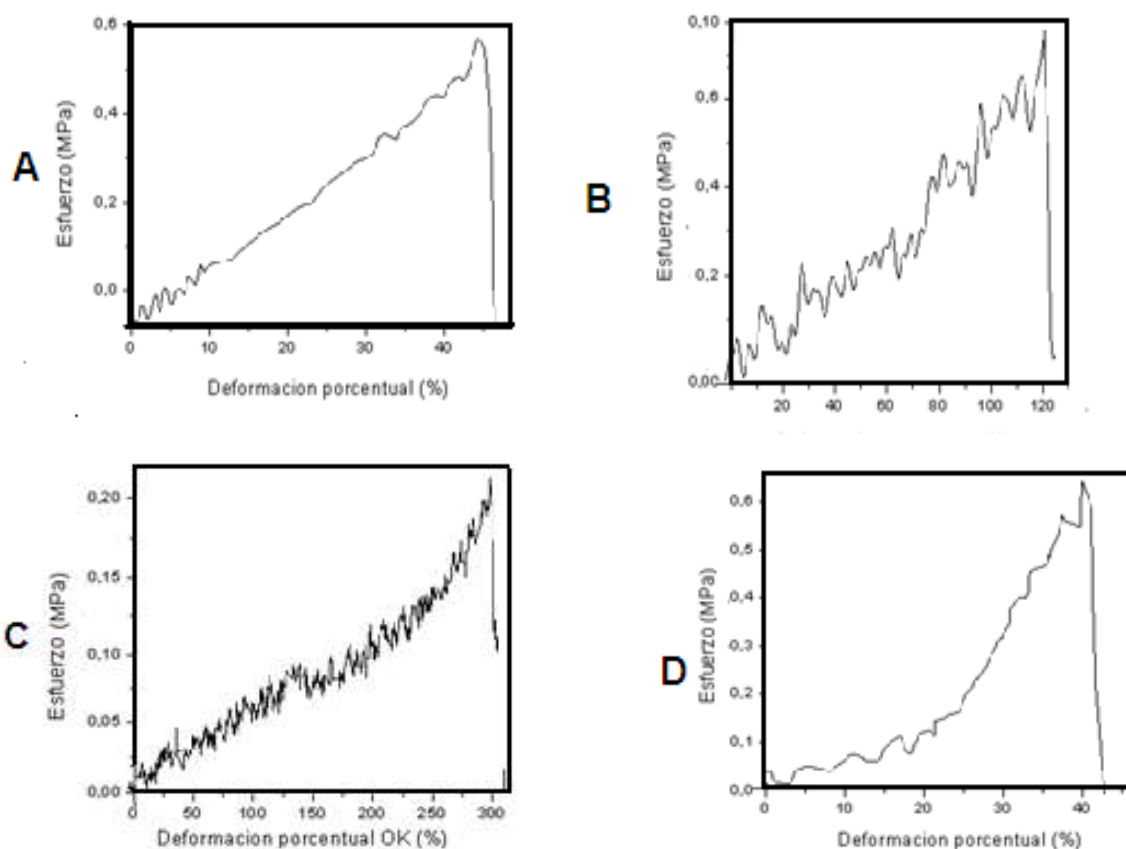
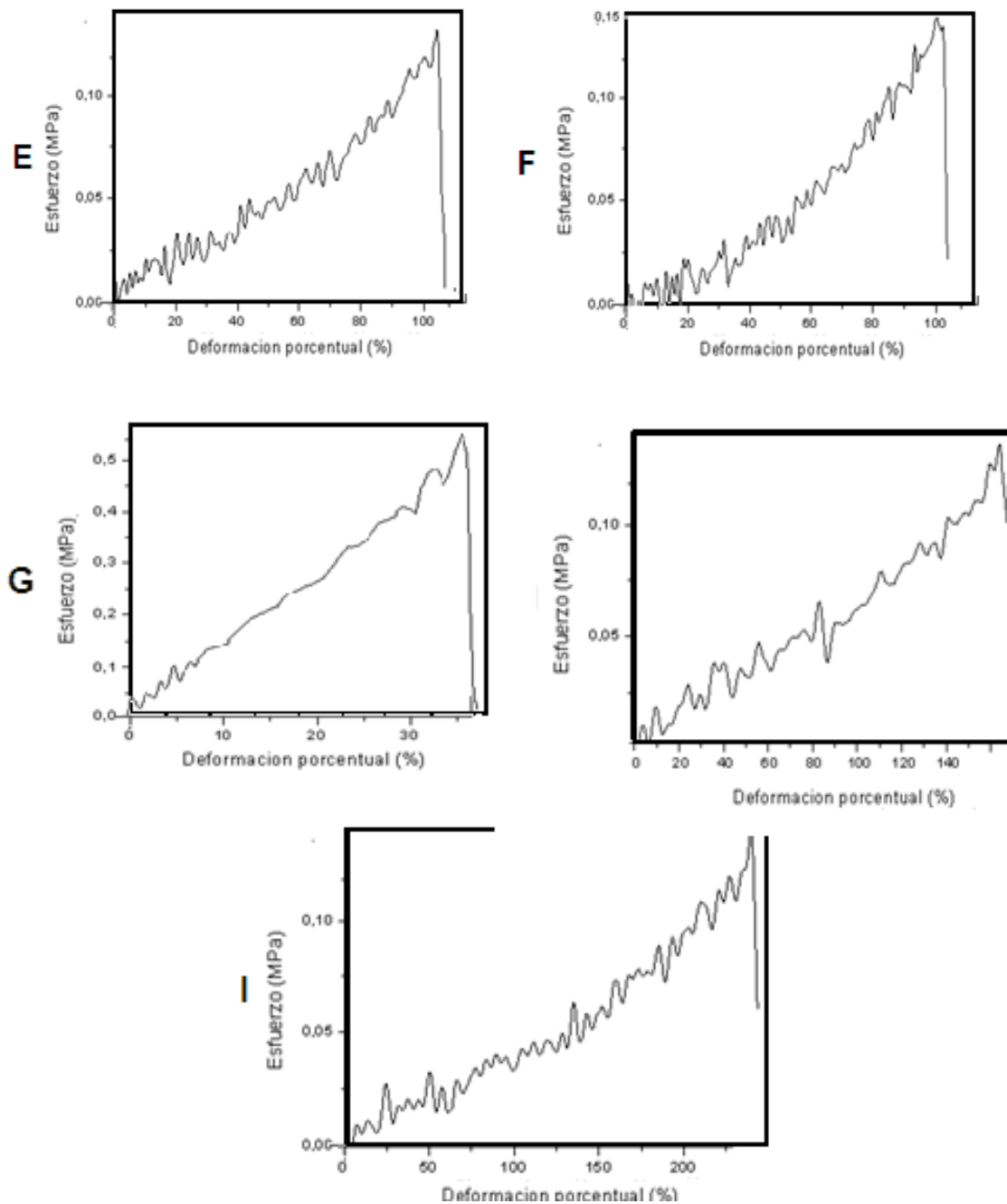


Figura 42 (continuación)



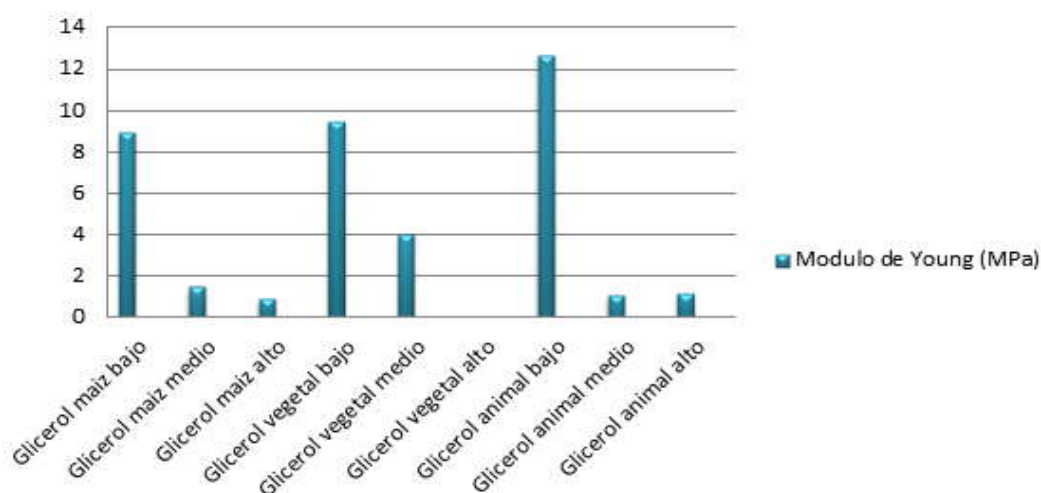
Las curvas de esfuerzo deformación, obtenidas a través de las pruebas de resistencia mecánica para las películas poliméricas en la maquina universal de ensayos INSTRON 3366, muestran un comportamiento pseudoplástico común en los polímeros característico de un elastómero. En las curvas se evidencia una deformación no lineal cuando las películas son sometidas a una carga, esto se debe a que las cadenas comienzan a desenroscarse hasta quedar extendidas. Posterior a esto, las películas continúan con una deformación elástica hasta donde los enlaces empiezan a estirarse y ocurre un encuellamiento donde el área se disminuye, logrando una deformación adicional hasta la ruptura total de sus enlaces.

Gracias a esto se pudo determinar que a una alta concentración de glicerol se tiene una mayor deformación elástica comparada con las deformación de las películas poliméricas de quitosano y almidón y una menor resistencia a la tensión, y por el contrario a baja concentración de glicerol, se tiene una menor plasticidad con una alta resistencia a la tensión.

Debido a la aplicación a la cual va orientada esta investigación, se determinó que la óptima relación fue quitosano – glicerol maíz alto que se muestra en la Figura 28-C. Esta muestra presentó una deformación promedio de 311,667 % con una tensión promedio en la carga máxima de 0,249 MPa.

El módulo de Young, relaciona el esfuerzo con la deformación unitaria que experimenta un objeto al ser sometido a cargas externas. En la Figura 43 se muestra un resumen de los resultados del módulo de Young obtenido para cada uno de los tipos de glicerol en sus diferentes concentraciones, empleados para la fabricación de las películas poliméricas.

Figura 43: Histograma que representa el módulo de Young vs concentración de glicerol.



En la Figura 43, se observa que a mayor concentración de glicerol el módulo de Young tiende a disminuir; por el contrario a menor concentración de glicerol el módulo de Young aumenta.

6.4. OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS QUITOSANO, GLICEROL DE MAÍZ Y SiO_2

Conociendo que las películas poliméricas con mejores características de resistencia mecánica fueron las obtenidas mediante la combinación de quitosano y glicerol de maíz en alta concentración, se tiene la receta o combinación adecuada para la fabricación de las películas poliméricas de quitosano glicerol de maíz y SiO_2 , que puede observarse en el cuadro 15.

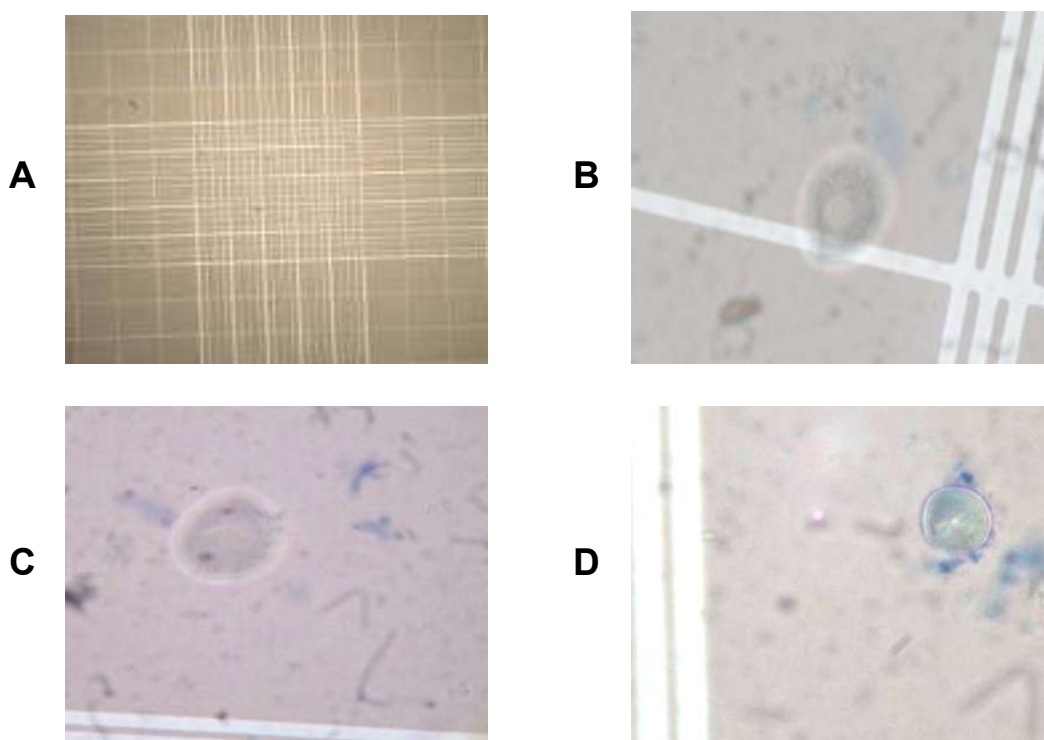
Cuadro 15: Receta o concentraciones adecuadas para la fabricación de las películas poliméricas de quitosano, glicerol de maíz y SiO_2

| | |
|---------------------------------------|----------------|
| Temperatura | 24°C \pm 3°C |
| Humedad relativa | 60% \pm 5% |
| Quitosano | 3,048 g |
| Tipo de Glicerol | Maíz |
| Concentración glicerol | 0,889 mL |
| Tiempo de agitación quitosano | 6 horas |
| Velocidad agitación quitosano | 7000 RPM |
| Tiempo agitación glicerol | 2 horas |
| Velocidad agitación glicerol | 7000 RPM |
| Dióxido de Silicio | 0,38 g |
| Tiempo de agitación SiO_2 | 3 horas |
| Velocidad de agitación SiO_2 | 7000 RPM |
| Velocidad centrifugado del compuesto | 3500 RPM |
| Tiempo centrifugado | 8 minutos |
| Tiempo reposo de las películas | 4 días |
| Tiempo secado al horno | 2 días |
| Temperatura del horno | 40°C |

6.5. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD

Llevado a cabo el procedimiento para la determinación de la viabilidad celular de las muestras, se obtuvo un óptimo resultado, después del análisis realizado a través del microscopio. En la Figura 44, se muestran los linfocitos encontrados en las matrices de conteo, transcurridos los días, observando linfocitos viables y no viables.

Figura 44: Matriz de conteo cámara de newbauer (A), Linfocitos viables (B) y (C), linfocito no viables (D), Supervivencia celular (linfocitos), laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali



A través de un cultivo de linfocitos llevado a cabo en el Laboratorio de ciencias biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente, se pudieron obtener una serie de imágenes. El proceso de cultivo fue llevado a cabo durante 4 días, en los cuales cada 24 horas se realizaba un conteo obteniendo imágenes de este, observando de esta manera los linfocitos viables y no viables en cada cuadrante de la matriz de conteo.

En el cuadro 16 se muestra la matriz obtenida para el conteo de linfocitos durante los 3 días de prueba, para la determinación de viabilidad celular.

Cuadro 16: Matriz de conteo celular del cultivo de linfocitos (conteo cada 24 horas)

| TIEMPO | MUESTRA | CUADRANTE 1 | CUADRANTE 2 | CUADRANTE 3 | CUADRANTE 4 | TOTAL | VIABLES | NO VIABLES |
|--------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|------------|------------|
| 0 H | No Muestra | 84 | 60 | 34 | 54 | 232 | 232 | 0 |
| 0 H | NO muestra | 43 | 74 | 87 | 76 | 280 | 280 | 0 |
| 0 H | NO muestra | 65 | 30 | 26 | 32 | 153 | 153 | 0 |
| 0 H | NO muestra | 61 | 25 | 67 | 65 | 218 | 218 | 0 |
| 0 H | NO muestra | 20 | 32 | 35 | 24 | 111 | 111 | 0 |
| TOTAL | | 273 | 221 | 249 | 251 | 994 | 994 | 0 |
| 24 H | Positivo | 92 | 47 | 87 | 67 | 293 | 288 | 5 |
| 24 H | SiO2 bajo | 40 | 62 | 34 | 56 | 192 | 178 | 14 |
| 24 H | SiO2 medio | 56 | 37 | 54 | 30 | 177 | 170 | 7 |
| 24 H | SiO2 alto | 62 | 21 | 54 | 57 | 194 | 178 | 16 |
| 24 H | Negativo | 23 | 35 | 27 | 14 | 99 | 1 | 98 |
| TOTAL | | 273 | 202 | 298 | 265 | 955 | 815 | 140 |
| 48 H | Positivo | 71 | 56 | 45 | 65 | 237 | 213 | 24 |
| 48 H | SiO2 bajo | 23 | 34 | 56 | 43 | 156 | 121 | 35 |
| 48 H | SiO2 medio | 45 | 45 | 61 | 45 | 196 | 131 | 65 |
| 48 H | SiO2 alto | 61 | 23 | 24 | 23 | 131 | 78 | 53 |
| 48 H | Negativo | 36 | 24 | 45 | 18 | 123 | 2 | 100 |
| TOTAL | | 236 | 182 | 231 | 194 | 843 | 545 | 298 |
| 72 H | Positivo | 90 | 54 | 67 | 56 | 267 | 213 | 54 |
| 72 H | SiO2 bajo | 67 | 76 | 37 | 76 | 256 | 178 | 78 |
| 72 H | SiO2 medio | 67 | 33 | 22 | 65 | 187 | 119 | 68 |
| 72 H | SiO2 alto | 43 | 46 | 54 | 56 | 199 | 129 | 70 |
| 72 H | Negativo | 16 | 34 | 32 | 20 | 102 | 0 | 102 |
| TOTAL | | 270 | 226 | 179 | 275 | 1011 | 639 | 372 |

Material positivo: Película polimérica de quitosano y glicerol orgánico de maíz en alta proporción. La película polimerica de quitosano y glicerol es un material biocompatible, con un porcentaje de compatibilidad con el entorno fisiológico de 78,9 %³⁵.

SiO₂ bajo: Película polimérica de quitosano, glicerol orgánico de maíz en alta proporción y dióxido de silicio en baja proporción.

SiO₂ medio: Película polimérica de quitosano, glicerol orgánico de maíz en alta proporción y dióxido de silicio en media proporción.

SiO₂ alto: Película polimérica de quitosano, glicerol orgánico de maíz en alta proporción y dióxido de silicio en alta proporción.

Material Negativo: Caucho.

En la matriz de conteo celular de linfocitos presentada en Tabla 14, se llevó a cabo un conteo cada 24 horas, depositando los datos de los linfocitos encontrados en cada cuadrante, obteniendo así un total de linfocitos viables y no viables.

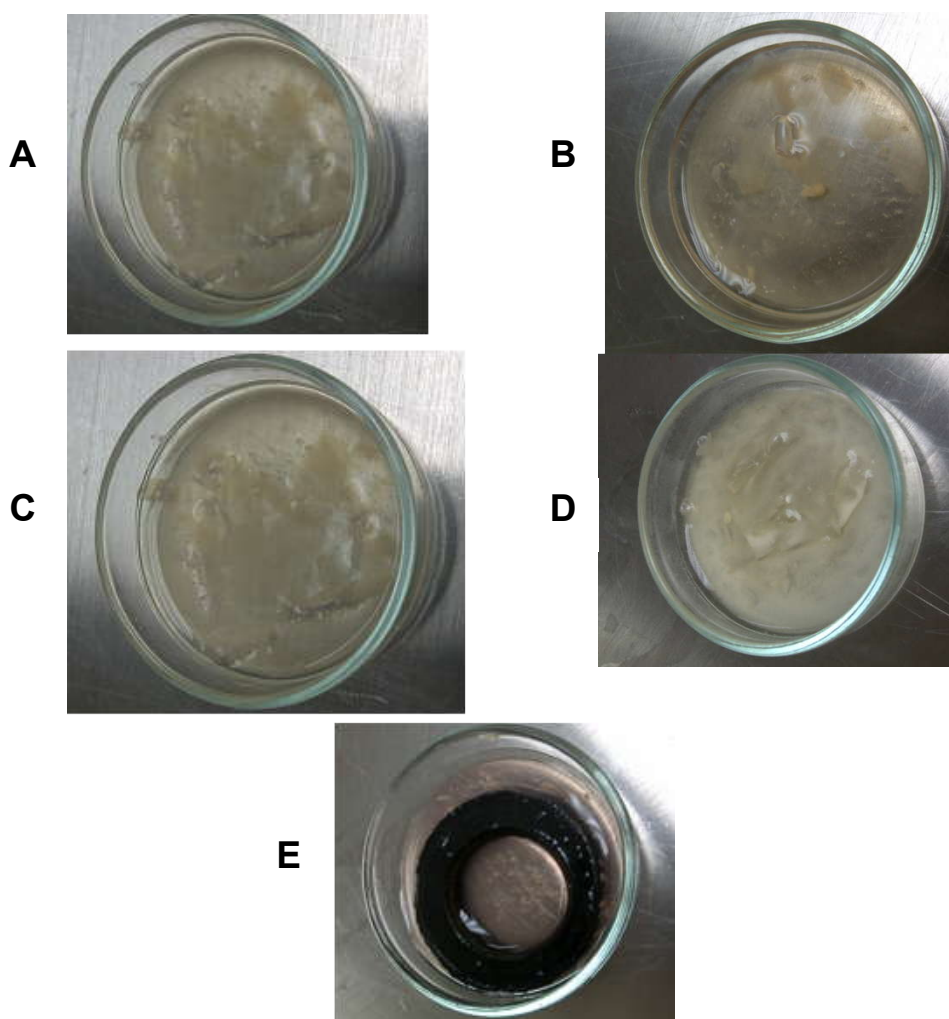
El análisis de los linfocitos viables y no viables se llevó a cabo para 5 muestras, el control positivo que es la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz. La muestra uno, compuesta de quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en baja proporción, la muestra dos, compuesta de quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en media proporción, la muestra tres, compuesta de quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en alta proporción, y por ultimo

³⁵ Zinels, J. Revista Iberoamericana de polímeros Volumen 8, enero de 2007 .: Materials Science : Materials in Medicine

contamos con el control negativo que en el caso de la investigación fue implementado un caucho.

En las imágenes mostradas en la Figura 45 se observan los materiales utilizados para las pruebas de toxicidad.

Figura 45: Control positivo “película polimérica, quitosano y glicerol maíz (A), Muestra UNO “Película polimérica, quitosano, glicerol maíz y dióxido de silicio en baja proporción (B), Muestra DOS “Película polimérica, quitosano, glicerol maíz y dióxido de silicio en media proporción (C), Muestra TRES “Película polimérica, quitosano, glicerol maíz y dióxido de silicio en alta proporción (D), Control negativo “caucho” (E), Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Occidente Cali.

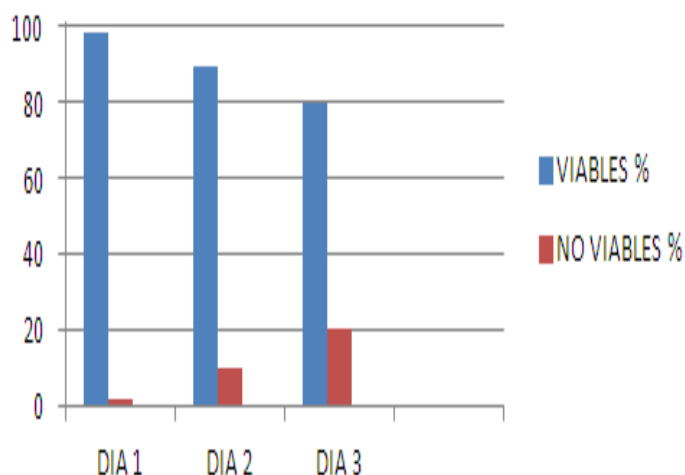


Fue tomado como control positivo del experimento, la película polimérica de quitosano y glicerol de maíz, pues se reporta en la literatura una biocompatibilidad óptima, para posibles aplicaciones biomédicas³⁶.

EL material implementado como control negativo fue el caucho, pues no se tienen reportes de la biocompatibilidad del material, obteniendo como resultado mediante el análisis de toxicidad llevado a cabo que el material no presenta viabilidad celular ante el cultivo de linfocitos.

En la Figura 46, se muestra el resultado obtenido en porcentaje de linfocitos viables y no viables expuestos a la película de quitosano y glicerol maíz.

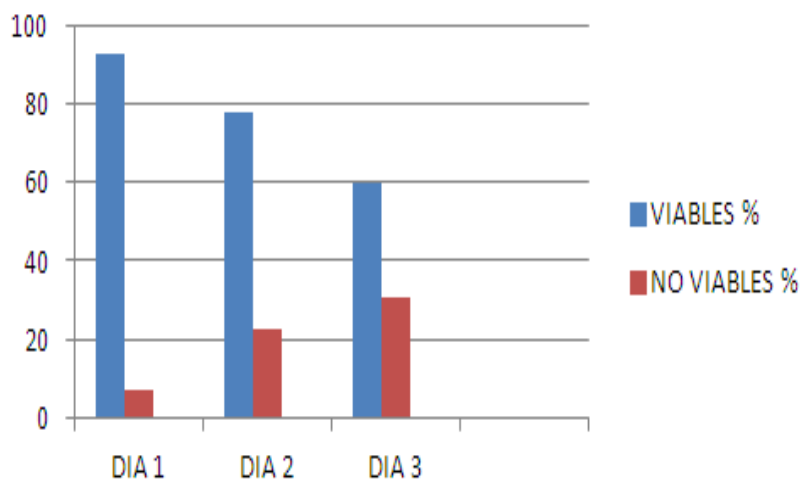
Figura 46: Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control positivo (película polimérica de quitosano y glicerol maíz), durante los 3 días.



En la Figura 47, se muestra el resultado obtenido en porcentaje de linfocitos viables y no viables expuestos a la película de quitosano y glicerol maíz y SiO₂ en baja concentración.

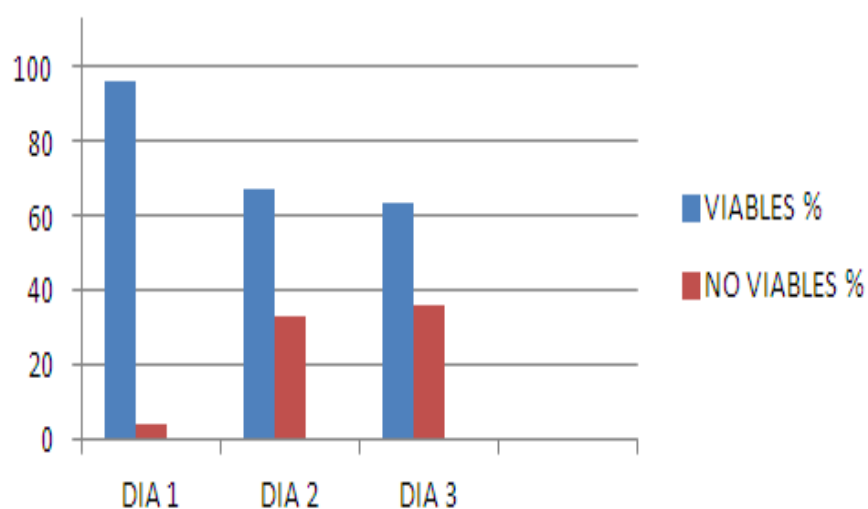
³⁶ KEAN T, THANOU M, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, Western Reserve University, Orthopaedics Department, Cleveland, Ohio, Contents lists available at ScienceDirect.

Figura 47: Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control muestra uno (quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en baja proporción), durante los 3 días.



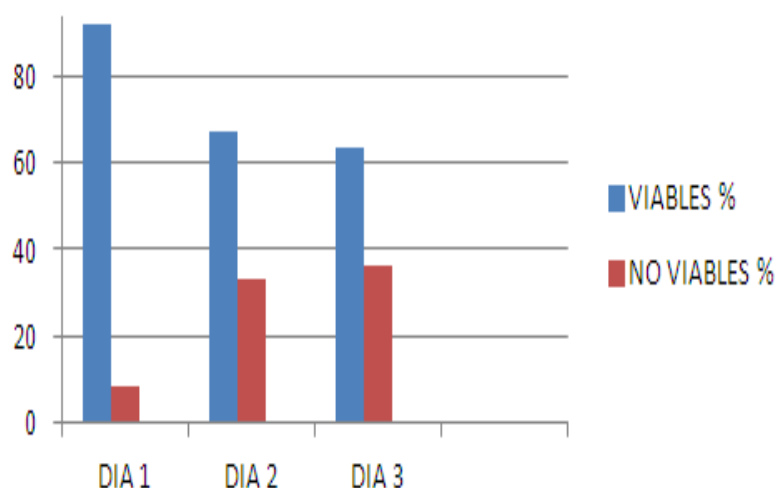
En la Figura 48, se muestra el resultado obtenido en porcentaje de linfocitos viables y no viables expuestos a la película de quitosano y glicerol maíz y SiO_2 en mediana concentración.

Figura 48: Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control muestra dos (quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en mediana proporción), durante los 3 días.



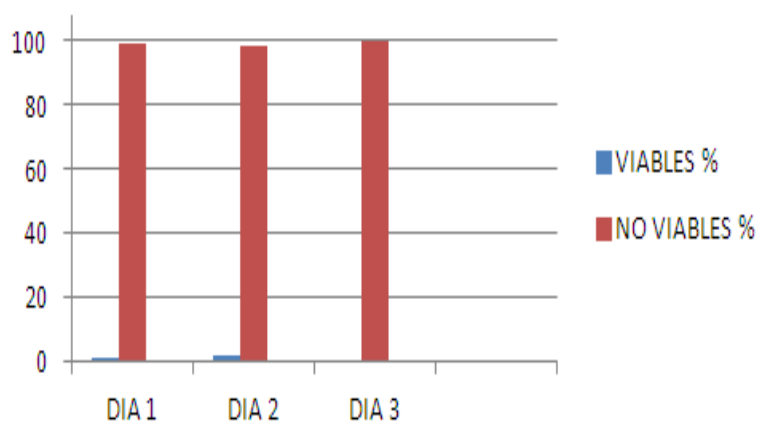
En la Figura 49, se muestra el resultado obtenido en porcentaje de linfocitos viables y no viables expuestos a la película de quitosano y glicerol maíz y SiO₂ en alta concentración.

Figura 49: Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control muestra tres (quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio en alta proporción), durante los 3 días.



En la Figura 50, se muestra el resultado obtenido en porcentaje de linfocitos viables y no viables expuestos al control negativo (caucho).

Figura 50: Barras porcentuales de linfocitos viables y no viables expuestos al control negativo (caucho) durante los 3 días.



En el cuadro 17, se muestran los porcentajes de linfocitos viables durante los tres días de conteo.

Cuadro 17: Porcentaje de linfocitos viables para cada muestra durante los tres días

| | % DIA UNO | % DIA DOS | % DIA TRES |
|------------------------------|-----------|-----------|------------|
| POSITIVO | 98,30 | 89,90 | 79,80 |
| SiO₂ BAJO | 92,70 | 77,70 | 69,53 |
| SiO₂ MEDIO | 96,00 | 66,90 | 63,70 |
| SiO₂ ALTO | 91,80 | 60,00 | 72,10 |
| NEGATIVO | 1,01 | 1,62 | 0,00 |

En el cuadro 18, se muestran los porcentajes de linfocitos no viables durante los tres días de conteo.

Cuadro 18: Porcentaje de linfocitos no viables para cada muestra durante los tres días

| | % DIA UNO | % DIA DOS | % DIA TRES |
|------------------------------|-----------|-----------|------------|
| POSITIVO | 1,70 | 10,10 | 20,20 |
| SiO₂ BAJO | 7,30 | 22,30 | 30,47 |
| SiO₂ MEDIO | 4,00 | 33,10 | 36,30 |
| SiO₂ ALTO | 8,20 | 40,00 | 27,90 |
| NEGATIVO | 98,99 | 98,38 | 100,00 |

Para la determinación de la viabilidad celular se tomaron los resultados obtenidos para los linfocitos sometidos a cada una de las muestras en los tres días, obteniendo un total de células viables y un porcentaje para cada una de ellas, como se observa en la tabla 15. El porcentaje de células viables fue obtenido mediante la relación entre el total de linfocitos viables para cada una

de las muestras, incluyendo los dos controles y el total de linfocitos contados en los tres días. Este cálculo se llevo a cabo mediante la ecuación 5.

$$Viabilidad \% = \frac{\text{Numero de células viables}}{\text{total de células encontradas}} \times 100 \quad [5]$$

En cuadro 19, se muestran los porcentajes de viabilidad celular para cada una de las muestras y el número de linfocitos viables y no viables.

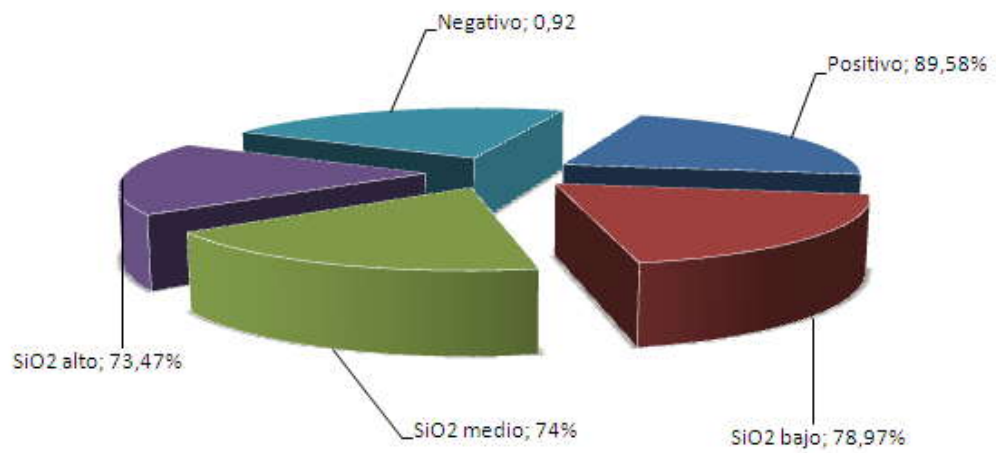
Cuadro 19: Comparación estadística para determinación de viabilidad celular

| MUESTRA | LINFOCITOS VIABLES | TOTAL LINFOCITOS | % VIABILIDAD CELULAR |
|------------------------|--------------------|------------------|----------------------|
| POSITIVO | 714 | 797 | 89,58 |
| SiO ₂ BAJO | 477 | 604 | 78,97 |
| SiO ₂ MEDIO | 420 | 560 | 75,00 |
| SiO ₂ ALTO | 385 | 524 | 73,47 |
| NEGATIVO | 3 | 324 | 0,92 |

Llevando a cabo la comparación de los datos obtenidos en el porcentaje de viabilidad celular, se determina que posee un mejor comportamiento al ser expuestas a un medio fisiológico in vitro la muestra de quitosano, glicerol maíz en alta concentración y dióxido de silicio en baja concentración (**SiO₂ BAJO**), ya que presentó un alto porcentaje de viabilidad celular en las pruebas de citotoxicidad.

En la Figura 51, se muestran los porcentajes de viabilidad celular para cada una de las muestras, transcurrido el tiempo de conteo.

Figura 51: Porcentaje de viabilidad celular para cada una de las muestras transcurridos los tres días de conteo.



6.6 ANÁLISIS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LAS PELÍCULAS POLIMÉRICAS (SEM)

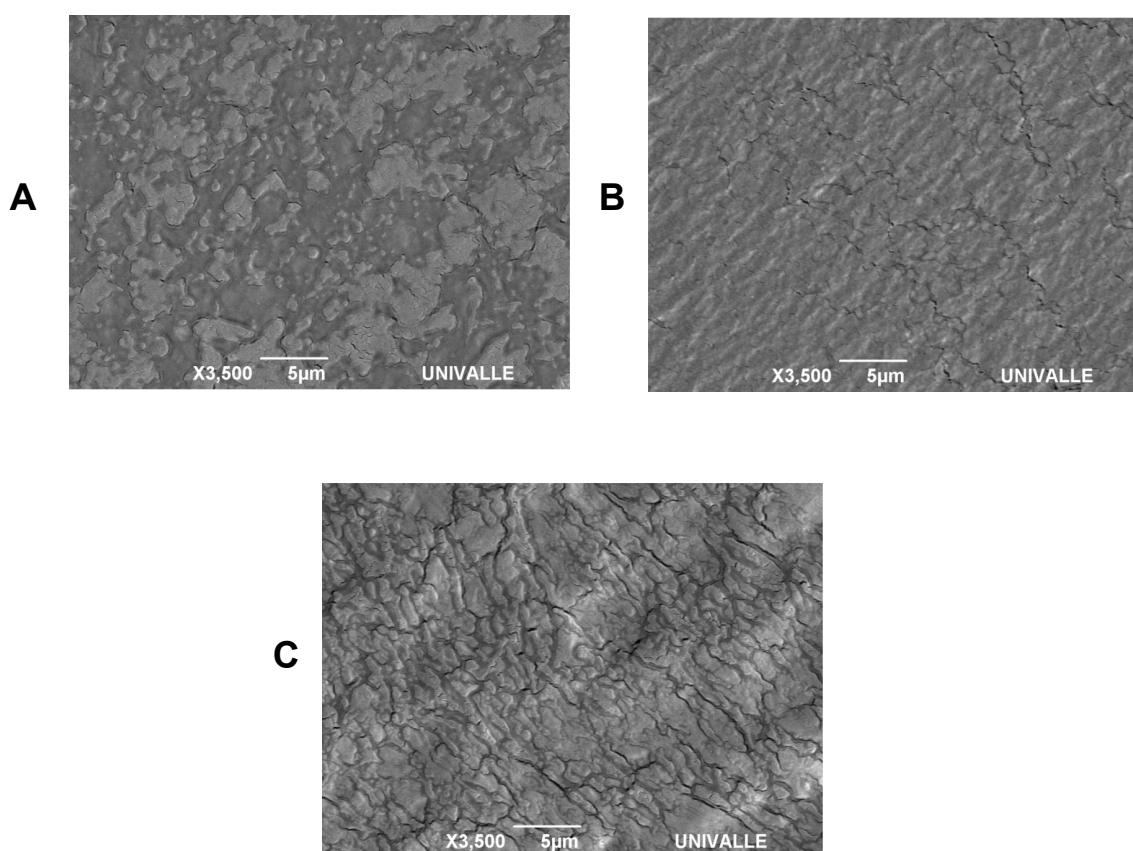
6.6.1. Muestras recubiertas con oro en la Cámara de Vacío Denton Vacuum. Transcurridos aproximadamente 15 minutos de haber sido introducidas las películas poliméricas en la Cámara de Vacío, fueron retiradas observando las capas de oro que recubren a la muestra como se observa en la Figura 52.

Figura 52: Muestras recubiertas con oro en la cámara de Vacío Denton Vacuum, Laboratorio Escuela de Materiales, Universidad del Valle.



6.6.2. Resultados obtenidos para las pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido. Recubiertas las películas poliméricas con oro, fueron procesadas en el Microscopio Electrónico de Barrido, para llevar a cabo un análisis morfológico de las muestras a través de las imágenes resultantes de las pruebas. En la Figura 53, se muestran las imágenes obtenidas para el análisis llevado a cabo en las películas poliméricas de quitosano, glicerol de maíz en alta concentración y dióxido de silicio en las tres concentraciones (baja, media y alta).

Figura 53: Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido para película polimerica de quitosano, glicerol maiz alta concentracion y dióxido de silicio en baja concentracion (0,25%) (A), Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido para película polimerica de quitosano, glicerol maiz alta concentracion y dióxido de silicio en media concentracion (0,5%) (B), Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido para película polimerica de quitosano, glicerol maiz alta concentracion y dióxido de silicio en alta concentracion (0,75%) (C), Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6490LV, Escuela de materiales de la Universidad del Valle.



En la Figura 53, se muestran las imágenes obtenidas para las pruebas de Microscopía Electrónica de Barrido, observando que no se presentan fracturas en la estructura de las películas, por el contrario sus superficies presentan homogeneidad y tampoco se observan porosidades. Esta estructura hace que el material tenga características adecuadas para la aplicación que se desea, pues se requiere que el material dure algún tiempo en la piel del individuo sin presentar fracturas.

7. CONCLUSIONES

En esta investigación se obtuvieron películas poliméricas basadas en dióxido de silicio encapsulado en una matriz de quitosano y glicerol orgánico a través del método de evaporación lenta, las cuales fueron caracterizadas mediante distintas técnicas. A partir de este estudio, podemos concluir lo siguiente:

- Empleando el método de evaporación lenta se obtiene un secado uniforme de los materiales, dando como resultado una película consistente.
- Para lograr la uniformidad de las muestras a través del método de evaporación lenta, es necesario determinar un tiempo de reposo y posterior a este, establecer un tiempo a temperatura controlada.
- Para lograr la uniformidad de las películas a través del método de evaporación lenta, se requiere que estas sean cubiertas con una campana acrílica para controlar las variables de humedad y temperatura, evitando impurezas y alteración en su estructura.
- La humedad, la temperatura y el tiempo son factores ambientales que deben ser controlados para la fabricación de las películas.
- Para la estandarización del método de obtención de películas poliméricas se llevó a cabo un diseño experimental de superficie de respuestas y optimización simultánea de variables, que arrojó el valor óptimo de concentración de glicerol dando un 7 % (0,889 mL) para la fabricación de las películas poliméricas.
- La deformación alcanzada por la película es directamente proporcional a la alta concentración de glicerol e inversamente proporcional a la resistencia a la tensión.
- Se puede modificar las propiedades de las películas poliméricas, variando la concentración del glicerol.

- Llevado a cabo el análisis de las propiedades mecánicas de las películas poliméricas, se observó que el glicerol de maíz presenta el más alto grado de deformación (311,667%).
- Como resultado del análisis de las propiedades mecánicas de las películas a través de la Máquina universal de ensayos INSTRON, se obtuvo que el glicerol de maíz en alta concentración presentó una deformación promedio de 311,667 %. Este resultado permite que las películas sean elásticas, lo que facilita su adaptación a la forma de las zonas a las cuales vayan a ser aplicadas.
- Las pruebas de resistencia mecánica realizadas a las películas poliméricas arrojaron curvas de esfuerzo – deformación con un comportamiento pseudoplástico característico de los polímeros.
- Llevado a cabo el proceso de mezcla del glicerol y quitosano, es necesario realizar un proceso de centrifugado de dicho compuesto, para evitar así que moléculas de oxígeno causen porosidad en las películas ocasionando alteración en las propiedades mecánicas de estas.
- La concentración baja de dióxido de Silicio SiO_2 posee una mayor compatibilidad con el entorno fisiológico, obteniendo como resultado para ello un 78,97 % de linfocitos vivos al tercer y último día de conteo.
- Con los resultados obtenidos de las pruebas de Microscopia Electrónica de barrido se pudo concluir que las películas poseen una superficie totalmente homogénea y no tienen ningún tipo de porosidad.

8. RECOMENDACIONES

- Los implementos a utilizarse para la fabricación de las películas deben estar totalmente limpios, pues las impurezas pueden alterar la estructura y las propiedades mecánicas de estas.
- El tiempo de agitación de los reactivos debe ser controlado y de aproximadamente 6 horas, a una velocidad constante de 7000 RPM.
- La mezcla de quitosano y glicerol debe ser centrifugada, posterior al proceso de mezclado, esto con el fin de eliminar las moléculas de oxígeno que alteran las propiedades físicas y mecánicas de las películas.
- Es necesario limpiar los moldes de teflón con alcohol, y secarlos al ambiente, esto se hace para desinfectar y evitar que impurezas que puede contener el implemento que se use para el secado se adhieran al teflón.
- Es necesario nivelar el lugar en el cual se van a dejar las películas durante el tiempo necesario establecido para la evaporación y secado de la mezcla.
- La mezcla debe dejarse a temperatura ambiente durante cuatro días, y posterior a este tiempo debe colocarse en un horno a una temperatura constante de 40 °C durante tres días.
- La mezcla debe ser cubierta con una campana acrílica durante el tiempo de secado a temperatura ambiente, esto con el fin de evitar que caigan impurezas a estas, y mantener una humedad controlada.
- Para la realización de las pruebas de resistencia mecánica, en la Maquina universal de ensayos INSTRON, se recomienda colocar en los extremos de

la película a analizarse cintas a una distancia de 25 mm del borde externo hacia el interior. Esto para facilitar el agarre de los grips a la película, y evitar así también que se adhiera la película a estos.

- El dióxido de silicio es un compuesto que en alta concentración es nocivo para la salud, es por ello que se recomienda el uso de tapabocas y guantes para la manipulación de este.
- El pesaje del dióxido de silicio debe hacerse en una balanza con campana, para evitar que las partículas del compuesto salgan y se dispersen por el aire.
- Se sugiere utilizar la Técnica de Microscopia Electrónica de Transmisión en futuros desarrollos, con el fin de verificar la dispersión homogénea de las nanopartículas en el compuesto.
- Para el proceso de agitación de los reactivos en la plancha de agitación, es necesario cubrir los Baker con papel parafina, esto para evitar que impurezas caigan en la mezcla.
- Para las pruebas de citotoxicidad se recomienda esterilizar todos los implementos a utilizarse.
- La manipulación final de las películas poliméricas debe hacerse de forma controlada y con la mayor asepsia posible, para evitar posibles contaminaciones con partículas ajenas al material.

GRUPOS DE INVESTIGACION

Miembros del Semillero de Biomateriales del Grupo de Investigación de Materiales Avanzados para Micro y Nano Tecnología IMAMNT, Universidad Autónoma de Occidente.

BIBLIOGRAFIA

ALCALDE, MARÍA TERESA. DEL POZO, ALFONSO. Silicio como activo en cosmética, Unidad de tecnología farmacéutica. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona. 2008.

CAPRILE, María Daniela. Obtención y Utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de Crustáceos. 2007. Tesis. Bahía Blanca, España. p. 84.

CÁRDENAS, Galo. Tratamientos de paciente, 2008. Disponible en internet: <http://www.quitoquimica.cl/tratamiento.html>.

CARHUAPOMA BERNABÉ, WILSON. CONTRERAS, JULIO SANTIAGO. Revista iberoamericana de polímeros. Vol. 6(4), diciembre de 2005.

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL, censo quemados 2005 - 2010. Disponible en internet en <http://www.cali.gov.co/publicaciones.php?id=36203>

ESPINDOLA GONZALEZ, M.ESTEVEZ, A.L. MARTINEZ HERNANDEZ, V.M. Obtención y caracterización microestructural de nanoparticulas de SiO₂ a partir de cascarilla de arroz, pulpa de café y bagazo de caña empleando bioprocesos a base de anélidos. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis. p.1

ESPITIA M., MUÑOZ BRAVO J.E., VARGAS C., ALMANZA O. Revista Colombiana de Física. 41, 2009. p. 360 – 364.

FALKE, G. ATALA, A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular, Citado el 13 octubre de 2011. Disponible en: www.sap.org.ar/staticfiles/archivos/2000/arch00_2/00_103_115.pdf

FERNÁNDEZ, Roberto. Novedoso parche a base de caparazones de crustáceos. en: Diario crónica. Chile. concepción, 19 de junio del 2007.

GALEANO, A., GUTIÉRREZ T., Estandarización de dos técnicas para evaluar actividad y viabilidad celular *in vitro* en respuesta a biomateriales. Tesis. Universidad Autónoma de Occidente. 2009.

KEAN T, THANOU M, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, Western Reserve University, Orthopaedics Department, Cleveland, Ohio, Contents lists available at ScienceDirect.

LEMUS CENTES, Juan Fernando. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón, Facultad de Ingeniería. Universidad Rafael Landívar, Octubre de 2007.

LERMA, FABIAN. PLAZAS GERMAN., diseño de una monocapa para recubrimientos con material W-DLC y Si-DLC en aplicaciones biomédicas. Tesis. Universidad Autonoma de Occidente. 2010.

MARTINEZ CAMACHO A.P. CORTEZ ROCHA M. EZQUERRA BRAUERA J.M., GRACIANO VERDUGO A.Z., RODRIGUEZ FÉLIX F., CASTILLO ORTEGA M.M., YÉPIZ GÓMEZ M.S., PLASCENCIA JATOMEAA M. Journal of Carbohydrate Polymers. 82, 2010. p. 305 – 315.

MING KONG, XI GUANG CHEN, KE XING, HYUN JIN PARK, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action. PR China, 2010. p. 53.

ORTÍZ, A. BRIANO, M. GALVÁN, R. Tesis, El microscopio electrónico de barrido un instrumento útil para la ciencia, Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2010.

ORTIZ RAMOS, J. SIERRA SÁNCHEZ, A. Quemaduras en el tercer mundo (tratamiento de quemados con recursos limitados). III congreso nacional de enfermería de quemados y cirugía plástica, Zaragoza, 2008.

SÁNCHEZ B. ANDRÉS, caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos. Trabajo de grado para optar Ingeniería biotecnológica. Costa rica.: Escuela de Biología 2006. 13 p.

VALDEZ, B. SCHORR, M. VALDEZ, E. CARRILLO, M. Revista Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano, 2009.

ZEGARRA, M. MONTESINOS, S. Trabajo de tesis, aplicaciones de microscopia electronica de barrido (sem) y analisis de fractura de una aleación de cu – 10 a1, Universidad de Chile, 2009.

ANEXOS

ANEXO A. Norma astmd82-10



Designation: D882 – 10

Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting¹

This standard is issued under the fixed designation D882; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon (ϵ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

These test methods have been approved for use by agencies of the Department of Defense to replace Method 1013 of Federal Test Method Standard 406.

1. Scope*

1.1 This test method covers the determination of tensile properties of plastics in the form of thin sheeting and films (less than 1.0 mm (0.04 in.) in thickness).

NOTE 1—Film is defined in Terminology D883 as an optional term for sheeting having a nominal thickness no greater than 0.25 mm (0.010 in.).

NOTE 2—Tensile properties of plastics 1.0 mm (0.04 in.) or greater in thickness shall be determined according to Test Method D638.

1.2 This test method can be used to test all plastics within the thickness range described and the capacity of the machine employed.

1.3 Specimen extension can be measured by grip separation, extension indicators, or displacement of gage marks.

1.4 The procedure for determining the tensile modulus of elasticity is included at one strain rate.

NOTE 3—The modulus determination is generally based on the use of grip separation as a measure of extension; however, the desirability of using extensometers, as described in 5.2, is recognized and provision for the use of such instrumentation is incorporated in the procedure.

1.5 Test data obtained by this test method is relevant and appropriate for use in engineering design.

1.6 The values stated in SI units are to be regarded as the standard. The values in parentheses are provided for information only.

1.7 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.*

NOTE 4—This test method is similar to ISO 527-3, but is not considered technically equivalent. ISO 527-3 allows for additional specimen configurations, specifies different test speeds, and requires an extensometer or gage marks on the specimen.

¹ These test methods are under the jurisdiction of ASTM Committee D20 on Plastics and are the direct responsibility of Subcommittee D20.19 on Molded and Extruded Products.

Current edition approved April 1, 2010. Published June 2010. Originally approved in 1946. Last previous edition approved in 2009 as D882 - 09. DOI: 10.1520/D0882-10.

2. Referenced Documents

2.1 ASTM Standards:²

D618 Practice for Conditioning Plastics for Testing

D638 Test Method for Tensile Properties of Plastics

D883 Terminology Relating to Plastics

D4000 Classification System for Specifying Plastic Materials

D5947 Test Methods for Physical Dimensions of Solid Plastics Specimens

D6287 Practice for Cutting Film and Sheeting Test Specimens

D6988 Guide for Determination of Thickness of Plastic Film Test Specimens

E4 Practices for Force Verification of Testing Machines

E691 Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method

2.2 ISO Standard:

ISO 527-3 Plastics—Determination of Tensile Properties—Part 3: Test Conditions for Films and Sheets³

3. Terminology

3.1 *Definitions*—Definitions of terms and symbols relating to tension testing of plastics appear in the Annex to Test Method D638.

3.1.1 *line grips*—grips having faces designed to concentrate the entire gripping force along a single line perpendicular to the direction of testing stress. This is usually done by combining one standard flat face and an opposing face from which protrudes a half-round.

3.1.2 *flat grips*—grips having flat faces and lined with thin rubber, crocus-cloth, emery cloth, or pressure-sensitive tape.

3.1.3 *tear failure*—a tensile failure characterized by fracture initiating at one edge of the specimen and progressing across

² For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, www.astm.org, or contact ASTM Customer Service at service@astm.org. For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

³ Available from American National Standards Institute (ANSI), 25 W. 43rd St., 4th Floor, New York, NY 10036, <http://www.ansi.org>.

*A Summary of Changes section appears at the end of this standard.

Copyright (C) ASTM International, 100 Barr Harbor Dr., PO box C-700 West Conshohocken, Pennsylvania 19428-2950, United States

Copyright by ASTM Int'l (all rights reserved); Fri Feb 18 15:24:39 EST 2011

Downloaded printed by

Universidad Del Valle pursuant to License Agreement. No further reproductions authorized.

the specimen at a rate slow enough to produce an anomalous load-deformation curve.

4. Significance and Use

4.1 Tensile properties determined by this test method are of value for the identification and characterization of materials for control and specification purposes. Tensile properties can vary with specimen thickness, method of preparation, speed of testing, type of grips used, and manner of measuring extension. Consequently, where precise comparative results are desired, these factors must be carefully controlled. This test method shall be used for referee purposes, unless otherwise indicated in particular material specifications. For many materials, there can be a specification that requires the use of this test method, but with some procedural modifications that take precedence when adhering to the specification. Therefore, it is advisable to refer to that material specification before using this test method. Table 1 in Classification D4000 lists the ASTM materials standards that currently exist.

4.2 Tensile properties can be utilized to provide data for research and development and engineering design as well as quality control and specification. However, data from such tests cannot be considered significant for applications differing widely from the load-time scale of the test employed.

4.3 The tensile modulus of elasticity is an index of the stiffness of thin plastic sheeting. The reproducibility of test results is good when precise control is maintained over all test conditions. When different materials are being compared for stiffness, specimens of identical dimensions must be employed.

4.4 The tensile energy to break (TEB) is the total energy absorbed per unit volume of the specimen up to the point of rupture. In some texts this property has been referred to as *toughness*. It is used to evaluate materials that are subjected to heavy abuse or that can stall web transport equipment in the event of a machine malfunction in end-use applications. However, the rate of strain, specimen parameters, and especially flaws can cause large variations in the results. In that sense, caution is advised in utilizing TEB test results for absorbed per unit volume of the specimen up to the point of rupture. In some texts this property has been referred to as *toughness*. It is used to evaluate materials that are subjected to heavy abuse or that can stall web transport equipment in the event of a machine malfunction in end-use applications. However, the rate of strain, specimen parameters, and especially flaws can cause large variations in the results. In that sense, caution is advised in utilizing TEB test results for end-use design applications.

4.5 Materials that fail by tearing give anomalous data which cannot be compared with those from normal failure.

5. Apparatus

5.1 *Testing Machine*—A testing machine of the constant rate-of-crosshead-movement type and comprising essentially the following:

5.1.1 *Fixed Member*—A fixed or essentially stationary member carrying one grip.

5.1.2 *Movable Member*—A movable member carrying a second grip.

5.1.3 *Grips*—A set of grips for holding the test specimen between the fixed member and the movable member of the testing machine; grips can be either the fixed or self-aligning type. In either case, the gripping system must minimize both slippage and uneven stress distribution.

5.1.3.1 *Fixed grips* are rigidly attached to the fixed and movable members of the testing machine. When this type of grip is used, care must be taken to ensure that the test specimen is inserted and clamped so that the long axis of the test

specimen coincides with the direction of pull through the center line of the grip assembly.

5.1.3.2 *Self-aligning grips* are attached to the fixed and movable members of the testing machine in such a manner that they will move freely into alignment as soon as a load is applied so that the long axis of the test specimen will coincide with the direction of the applied pull through the center line of the grip assembly. The specimens must be aligned as perfectly as possible with the direction of pull so that no rotary motion will cause slippage to occur in the grips; there is a limit to the amount of misalignment self-aligning grips will accommodate.

5.1.3.3 The test specimen shall be held in such a way that slippage relative to the grips is prevented insofar as possible. Grips lined with thin rubber, crocus-cloth, emery cloth, or pressure-sensitive tape as well as file-faced or serrated grips have been successfully used for many materials. The choice of grip surface will depend on the material tested, thickness, etc. Line grips padded on the round face with 0.75-1.00 mm (0.030-0.040 in.) blotting paper or filter paper have been found superior. Air-actuated grips have been found advantageous, particularly in the case of materials that tend to "neck" into the grips, since pressure is maintained at all times (see Notes 5-7). In cases where samples frequently fail at the edge of the grips, it could be advantageous to slightly increase the radius of curvature of the edges where the grips come in contact with the test area of the specimen.

Norm 5—Caution needs to be taken when choosing the type of grips and the type of grip surfaces to use for testing specimens films composed of high strength LLDPE and VLDPE resins. Test results tend to differ more when comparing these types of specimens films tested with the grips lined with different materials.

Norm 6—The gage of pressure sensitive tape, thin rubber, crocus-cloth, and emery cloth needs to be adequate enough to prevent slipping and premature failures of the test specimens (for example, pressure sensitive tape is used on the surface of the grips; the test specimen can may begin to tear at the edge of the grips during the test if the tape is too thin.).

Norm 7—The grit size of crocus-cloth and emery cloth is suggested to be at least 800. The use of these materials helps to prevent test specimens lined with different materials.

Norm 6—The gage of pressure sensitive tape, thin rubber, crocus-cloth, and emery cloth needs to be adequate enough to prevent slipping and premature failures of the test specimens (for example, pressure sensitive tape is used on the surface of the grips; the test specimen can may begin to tear at the edge of the grips during the test if the tape is too thin.).

Norm 7—The grit size of crocus-cloth and emery cloth is suggested to be at least 800. The use of these materials helps to prevent test specimens from slipping in the grips. One must be cautious when using these materials so that premature failures of the test specimens do not occur.

5.1.4 *Drive Mechanism*—A drive mechanism for imparting to the movable member a uniform, controlled velocity with respect to the stationary member. The velocity shall be regulated as specified in Section 9.

5.1.5 *Load Indicator*—A suitable load-indicating mechanism capable of showing the total tensile load carried by the test specimen held by the grips. This mechanism shall be essentially free of inertial lag at the specified rate of testing (see Note 8). Unless a suitable extensometer is used (see 5.2), the motion of the weighing system shall not exceed 2 % of the specimen extension within the range being measured. The load indicator shall determine the tensile load applied to the specimen with an accuracy of ± 1 % of the indicated value, or better. The accuracy of the testing machine shall be verified in accordance with Practices E4.

5.1.6 *Crosshead Extension Indicator*—A suitable extension-indicating mechanism capable of showing the amount of change in the separation of the grips, that is, crosshead movement. This mechanism shall be essentially free of inertial

lag at the specified rate of testing (see **Note 8**) and shall indicate the crosshead movement with an accuracy of $\pm 1\%$ of the indicated value, or better.

5.2 Extensometer (Optional)—A suitable instrument used for determining the distance between two designated points on the test specimen as the specimen is stretched. The use of this type of instrument is optional and is not required in this test method. This apparatus, if employed, shall be so designed as to minimize stress on the specimen at the contact points of the specimen and the instrument (see **8.3**). It is desirable that this instrument automatically record the distance, or any change in it, as a function of the load on the test specimen or of the elapsed time from the start of the test, or both. If only the latter is obtained, load-time data must also be taken. This instrument must be essentially free of inertial lag at the specified speed of testing (see **Note 8**).

5.2.1 Modulus of Elasticity and Low-Extension Measurements—Extensometers used for modulus of elasticity and low-extension (less than 20 % elongation) measurements shall, at a minimum, be accurate to $\pm 1\%$ and comply with the requirements set forth in Practice E83 for a Class C instrument.

5.2.2 High-Extension Measurements—Instrumentation and measuring techniques used for high-extension (20 % elongation or greater) measurements shall be accurate to $\pm 10\%$ of the indicated value, or better.

Note 8—A sufficiently high response speed in the indicating and recording system for the load and extension data is essential. The response speed required of the system will depend in part on the material tested (high or low elongation) and the rate of straining.

5.3 Thickness Gauge—A dead-weight dial or digital micrometer as described in Test Methods D5947 or D6988 as appropriate for the material or specimen geometry being tested.

5.4 Width-Measuring Devices—Suitable test scales or other width measuring devices capable of measuring 0.25 mm (0.010 in.) or less.

5.5 Specimen Cutter—Refer to Practice D6287 for the apparatus and techniques for cutting film and sheeting used in this test method.

5.5.1 Devices that use razor blades have proven especially suitable for materials having an elongation-at-fracture above 10 to 20 %.

5.5.2 The use of a punch press or a striking die is not recommended because of their tendency to produce poor and inconsistent specimen edges.

5.5.3 The use of a cutting template and a single razor blade is not recommended as it will affect the parallelism of the test specimen.

6. Test Specimens

6.1 The test specimens shall consist of strips of uniform width and thickness at least 50 mm (2 in.) longer than the grip separation used.

6.2 The nominal width of the specimens shall be not less than 5.0 mm (0.20 in.) or greater than 25.4 mm (1.0 in.).

6.3 A width-thickness ratio of at least eight shall be used. Narrow specimens magnify effects of edge strains or flaws, or both.

6.4 The utmost care shall be exercised in cutting specimens to prevent nicks and tears that cause premature failures (see **Note 9**). The edges shall be parallel to within 5 % of the width over the length of the specimen between the grips.

Note 9—Microscopical examination of specimens can be used to detect flaws due to sample or specimen preparation.

6.5 Test specimens shall be selected so that thickness is uniform to within 10 % of the thickness over the length of the specimen between the grips in the case of specimens 0.25 mm (0.010 in.) or less in thickness and to within 5 % in the case of specimens greater than 0.25 mm (0.010 in.) in thickness but less than 1.00 mm (0.040 in.) in thickness.

Note 10—In cases where thickness variations are in excess of those recommended in **6.5**, results tend not to be characteristic of the material under test.

6.6 If the material is suspected of being anisotropic, two sets of test specimens shall be prepared having their long axes respectively parallel with and normal to the suspected direction of anisotropy.

6.7 For tensile modulus of elasticity determinations, a specimen gage length of 250 mm (10 in.) shall be considered as standard. This length is used in order to minimize the effects of grip slippage on test results. When this length is not feasible, test sections as short as 100 mm (4 in.) can be used if it has been shown that results are not appreciably affected. However, the 250-mm (10-in.) gage length shall be used for referee purposes. The speed of testing of shorter specimens must be adjusted in order for the strain rate to be equivalent to that of the standard specimen.

Note 11—Two round robin tests⁴ have shown that, for materials of less than 0.25-mm (0.010 in.) in thickness, fine grips padded on the round side with 1.0-mm (0.040-in.) blotting paper give the same results with a 100-mm (4-in.) test section as a 250-mm (10-in.) test section produces with flat-face grips.

Note 12—Excessive jaw slippage becomes increasingly difficult to overcome in cases where high modulus materials are tested in thicknesses greater than 0.25 mm (0.010 in.).

7. Conditioning

7.1 Conditioning—Condition the test specimens at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ($73.4 \pm 3.6^\circ\text{F}$) and $50 \pm 10\%$ relative humidity for not less than 40 h prior to test in accordance with Procedure A of Practice D618 unless otherwise specified by agreement or the relevant ASTM material specification. In cases of disagreement, the tolerances shall be $\pm 1^\circ\text{C}$ ($\pm 1.8^\circ\text{F}$) and $\pm 5\%$ relative humidity.

7.2 Test Conditions—Conduct the tests at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ($73.4 \pm 3.6^\circ\text{F}$) and $50 \pm 10\%$ relative humidity unless otherwise specified by agreement or the relevant ASTM material specification. In cases of disagreement, the tolerances shall be $\pm 1^\circ\text{C}$ ($\pm 1.8^\circ\text{F}$) and $\pm 5\%$ relative humidity.

8. Number of Test Specimens

8.1 In the case of isotropic materials, at least five specimens shall be tested from each sample.

⁴ Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR:D20-1058.

TABLE 1 Crosshead Speeds and Initial Grip Separation

| Percent Elongation at Break | Initial Strain Rate, mm/mm-min (in./in.-min) | Initial Grip Separation | | Rate of Grip Separation | |
|---|--|-------------------------|-----|-------------------------|---------|
| | | mm | in. | mm/min | in./min |
| Modulus of Elasticity Determination | | | | | |
| | 0.1 | 250 | 10 | 25 | 1.0 |
| Determinations other than Elastic Modulus | | | | | |
| Less than 20 | 0.1 | 125 | 5 | 12.5 | 0.5 |
| 20 to 100 | 0.5 | 100 | 4 | 50 | 2.0 |
| Greater than 100 | 10.0 | 50 | 2 | 500 | 20.0 |

8.2 In the case of anisotropic materials, at least ten specimens, five normal and five parallel with the principal axis of anisotropy, shall be tested from each sample.

8.3 (Optional) A reduced number of test specimens may be tested and shall be noted in the report:

- (1) No less than three test specimens shall be tested.
- (2) No less than six test specimens in the case of anisotropic materials, three normal and three parallel with the principle axis of anisotropy, shall be tested.
- (3) Allowed for in-line quality control sampling.
- (4) Allowed for samples not sufficient in size to provide a minimum of five test specimens (10 test specimens for anisotropic materials).
- (5) Standard deviation is not to be calculated nor reported due to the reduced number of data points.

Specimens that fail at some obvious flaw or that fail outside the gage length shall be discarded and retests made, unless such flaws or conditions constitute a variable whose effect is being studied. However, jaw breaks (failures at the grip contact point) are acceptable if it has been shown that results from such tests are in essential agreement with values obtained from breaks occurring within the gage length.

Note 13—In the cases of some materials, examination of specimens, prior to and following testing, under crossed optical polarizers (polarizing films) provides a useful means of detecting flaws, which can be, or are, responsible for premature failure.

9. Speed of Testing

9.1 The speed of testing is the rate of separation of the two members (or grips) of the testing machine when running idle (under no load). This rate of separation shall be maintained within 5 % of the no-load value when running under full-capacity load.

9.2 The speed of testing shall be calculated from the required initial strain rate as specified in Table 1. The rate of grip separation shall be determined for the purpose of these test methods from the initial strain rate as follows:

$$A = BC \quad (1)$$

where:

- A = rate of grip separation, mm (or in.)/min,
 B = initial distance between grips, mm (or in.), and
 C = initial strain rate, mm/mm-min (or in./in.-min).

9.3 The initial strain rate shall be as in Table 1 unless otherwise indicated by the specification for the material being tested.

Note 14—Results obtained at different initial strain rates are not comparable; consequently, where direct comparisons between materials in various elongation classes are required, a single initial strain rate must be

used. For some materials it is advisable to select the strain rates on the basis of percent elongation at yield.

9.4 In cases where conflicting material classification, as determined by percent elongation at break values, results in a choice of strain rates, the lower rate shall be used.

9.5 If modulus values are being determined, separate specimens shall be used whenever strain rates and specimen dimensions are not the same as those employed in the test for other tensile properties.

10. Procedure

10.1 Select a load range such that specimen failure occurs within its upper two thirds. A few trial runs could be necessary to select a proper combination of load range and specimen width.

10.2 Measure the cross-sectional area of the specimen at several points along its length. Measure the width to an accuracy of 0.25 mm (0.010 in.) or better. Measure the thickness to an accuracy of 0.0025 mm (0.0001 in.) or better for specimens less than 0.25 mm (0.010 in.) in thickness and to an accuracy of 1 % or better for specimens greater than 0.25 mm (0.010 in.) but less than 1.0 mm (0.040 in.) in thickness.

10.3 Set the initial grip separation in accordance with Table 1.

10.4 Set the rate of grip separation to give the desired strain rate, based on the initial distance between the grips, in accordance with Table 1. Zero the calibrated load weighing system, extension indicator(s) and recording system.

Note 15—Extensometers can be used for modulus of elasticity determinations with the expectation of obtaining more accurate values than can be obtained using grip separation as the effective gage length. Precautions must be taken to ensure that extensometer slippage and undue stressing of the specimen do not occur. Refer also to 6.7.

10.5 In cases where it is desired to measure a test section other than the total length between the grips, mark the ends of the desired test section with a soft, fine wax crayon or with ink. Do not scratch these marks onto the surface since such scratches can act as stress raisers and cause premature specimen failure. Extensometers can be used if available; in this case, the test section will be defined by the contact points of the extensometer.

Note 16—Measurement of a specific test section is necessary with some materials having high elongation. As the specimen elongates, the accompanying reduction in area results in a loosening of material at the inside edge of the grips. This reduction and loosening moves back into the grips as further elongation and reduction in area takes place. In effect, this causes problems similar to grip slippage, that is, exaggerates measured extension.

10.6 Place the test specimen in the grips of the testing machine, taking care to align the long axis of the specimen with an imaginary line joining the points of attachment of the grips to the machine. Tighten the grips evenly and firmly to the degree necessary to minimize slipping of the specimen during test.

10.7 Start the machine and record load versus extension.

10.7.1 When the total length between the grips is used as the test area, record load versus grip separation.

10.7.2 When a specific test area has been marked on the specimen, follow the displacement of the edge boundary lines with respect to each other with dividers or some other suitable device. If a load-extension curve is desired, plot various extensions versus corresponding loads sustained, as measured by the load indicator.

10.7.3 When an extensometer is used, record load versus extension of the test area measured by the extensometer.

10.8 If modulus values are being determined, select a load range and chart rate to produce a load-extension curve of between 30 and 60° to the X axis. For maximum accuracy, use the most sensitive load scale for which this condition can be met. The test may be discontinued when the load-extension curve deviates from linearity.

10.9 In the case of materials being evaluated for secant modulus, the test can be discontinued when the specified extension is reached.

10.10 If tensile energy to break is being determined, some provision must be made for integration of the stress-strain curve. This can be either an electronic integration during the test or a subsequent determination from the area of the finished stress-strain curve (see [Annex A2](#)).

11. Calculation

11.1 Toe compensation shall be made in accordance with [Annex A1](#) unless it can be shown that the toe region of the curve is not due to the takeup of slack, seating of the specimen, or other artifact, but rather is an authentic material response.

11.2 *Breaking Factor* (nominal) shall be calculated by dividing the maximum load by the original minimum width of the specimen. The result shall be expressed in force per unit of width, usually newtons per metre (or pounds per inch) of width, and reported to three significant figures. The thickness of the film shall always be stated to the nearest 0.0025 mm (0.0001 in.).

Example—Breaking Factor = 1.75 kN/m (10.0 lbf/in.) of width for 0.1300-mm (0.0051-in.) thickness.

NOTE 17—This method of reporting is useful for very thin films (0.13 mm (0.005 in.) and less) for which breaking load is not proportional to cross-sectional area and whose thickness is difficult to determine with precision. Furthermore, films which are in effect laminar due to orientation, skin effects, nonuniform crystallinity, etc., have tensile properties disproportionate to cross-sectional area.

11.3 *Tensile Strength* (nominal) shall be calculated by dividing the maximum load by the original minimum cross-sectional area of the specimen. The result shall be expressed in force per unit area, usually megapascals (or pounds-force per square inch). This value shall be reported to three significant

figures. The maximum load can occur at the yield point, the breaking point, or in the area between the yield point and the breaking point.

NOTE 18—When tear failure occurs, so indicate and calculate results based on load and elongation at which tear initiates, as reflected in the load-deformation curve.

11.4 *Tensile Strength at Break* (nominal) shall be calculated in the same way as the tensile strength except that the load at break shall be used in place of the maximum load ([Note 18](#) and [Note 19](#)).

NOTE 19—In many cases tensile strength and tensile strength at break are identical, but not always.

11.5 *Percent Elongation at Break* shall be calculated by dividing the extension at the moment of rupture of the specimen by the initial gage length of the specimen and multiplying by 100. When gage marks or extensometers are used to define a specific test section, only this length shall be used in the calculation; otherwise the distance between the grips shall be used. The result shall be expressed in percent and reported to two significant figures (see [Note 18](#)).

11.6 *Tensile Yield Strength*, where applicable, shall be calculated by dividing the load at the yield point by the original minimum cross-sectional area of the specimen. The result shall be expressed in force per unit area, usually megapascals (or pounds-force per square inch). This value shall be reported to three significant figures. Alternatively, for materials that exhibit Hookean behavior in the initial part of the curve, an offset yield strength shall be obtained as described in the Appendix of Test Method [D638](#). In this case the value shall be given as “yield strength at —% offset.”

11.7 *Percent Elongation at Yield*, where applicable, shall be calculated by dividing the extension at the yield point by the initial gage length of specimen and multiplying by 100. When gauge marks or extensometers are used to define a specific test section, only this length shall be used in the calculation. Before calculating, correct the extension for “toe compensation” as described in [Annex A1](#). The results shall be expressed in percent and reported to two significant figures. When offset yield strength is used, the elongation at the offset yield strength shall be calculated.

11.8 *Elastic Modulus* shall be calculated by drawing a tangent to the initial linear portion of the load-extension curve, selecting any point on this tangent, and dividing the tensile stress by the corresponding strain. Before calculating, correct the extension for “toe compensation” as described in [Annex A1](#). For purposes of this determination, the tensile stress shall be calculated by dividing the load by the average original cross section of the test section. The result shall be expressed in force per unit area, usually megapascals (or pounds-force per square inch), and reported to three significant figures.

11.9 *Secant Modulus*, at a designated strain, shall be calculated by dividing the corresponding stress (nominal) by the designated strain. Elastic modulus values are preferable and shall be calculated whenever possible. However, for materials where no proportionality is evident, the secant modulus values shall be calculated. Draw the tangent as directed in [A1.3](#) and [Fig. A1.2](#) of [Annex A1](#), and mark off the designated strain from

TABLE 2 Precision Data for Modulus

| Material | Thickness, mils | Average, 10 ³ psi | Tangent Modulus | | | |
|----------|--------------------|---------------------------------|---|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | | | S_{ϵ} , 10 ³ psi | S_{σ} , 10 ³ psi | \bar{E} , 10 ³ psi | \bar{E}_s , 10 ³ psi |
| LDPE | 1.4 | 53.9 | 1.81 | 8.81 | 5.12 | 24.9 |
| HDPE | 1.6 | 101 | 5.47 | 16.2 | 15.5 | 45.9 |
| PP | 1.1 | 425 | 10.3 | 31.5 | 29.0 | 89.1 |
| PET | 0.9 | 672 | 13.8 | 55.5 | 39.1 | 157.1 |

| Material | Thickness, mils | Average, 10 ³ psi | Secant Modulus | | | |
|----------|--------------------|---------------------------------|---|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | | | S_{ϵ} , 10 ³ psi | S_{σ} , 10 ³ psi | \bar{E} , 10 ³ psi | \bar{E}_s , 10 ³ psi |
| LDPE | 1.4 | 45.0 | 2.11 | 3.43 | 5.98 | 9.70 |
| HDPE | 1.6 | 150 | 3.29 | 9.58 | 9.30 | 27.1 |
| PP | 1.1 | 372 | 4.66 | 26.5 | 13.2 | 74.9 |
| PET | 0.9 | 640 | 10.0 | 27.5 | 28.4 | 77.8 |

the yield point where the tangent line goes through zero stress. The stress to be used in the calculation is then determined by dividing the load at the designated strain on the load-extension curve by the original average cross-sectional area of the specimen.

11.10 *Tensile Energy to Break*, where applicable, shall be calculated by integrating the energy per unit volume under the stress-strain curve or by integrating the total energy absorbed and dividing it by the volume of the original gage region of the specimen. As indicated in Annex A2, this shall be done directly during the test by an electronic integrator, or subsequently by computation from the area of the plotted curve. The result shall be expressed in energy per unit volume, usually in megajoules per cubic metre (or inch-pounds-force per cubic inch). This value shall be reported to two significant figures.

11.11 For each series of tests, the arithmetic mean of all values obtained shall be calculated to the proper number of significant figures.

11.12 The standard deviation (estimated) shall be calculated as follows and reported to two significant figures:

$$s = \sqrt{(\sum X^2 - n \bar{X}^2)/(n-1)} \quad (2)$$

where:

- s = estimated standard deviation;
- X = value of a single observation;
- n = number of observations; and
- \bar{X} = arithmetic mean of the set of observations.

12. Report

12.1 Report the following information:

- 12.1.1 Complete identification of the material tested, including type, source, manufacturer's code number, form, principal dimensions, previous history, and orientation of samples with respect to anisotropy (if any).
- 12.1.2 Method of preparing test specimens.
- 12.1.3 Thickness, width, and length of test specimens.
- 12.1.4 Number of specimens tested.
- 12.1.5 Strain rate employed.
- 12.1.6 Grip separation (initial).
- 12.1.7 Crosshead speed (rate of grip separation).
- 12.1.8 Gage length (if different from grip separation).
- 12.1.9 Type of grips used, including facing (if any).
- 12.1.10 Conditioning procedure (test conditions, temperature, and relative humidity if nonstandard).

12.1.11 Anomalous behavior such as tear failure and failure at a grip.

12.1.12 Average breaking factor and standard deviation.

12.1.13 Average tensile strength (nominal) and standard deviation.

12.1.14 Average tensile strength at break (nominal) and standard deviation.

12.1.15 Average percent elongation at break and standard deviation.

12.1.16 Where applicable, average tensile energy to break and standard deviation.

12.1.17 In the case of materials exhibiting "yield" phenomenon: average yield strength and standard deviation; and average percent elongation at yield and standard deviation.

12.1.18 For materials which do not exhibit a yield point: average —% offset yield strength and standard deviation; and average percent elongation at —% offset yield strength and standard deviation.

12.1.19 Average modulus of elasticity and standard deviation (if secant modulus is used, so indicate and report strain at which calculated), and

12.1.20 When an extensometer is employed, so indicate.

13. Precision and Bias

13.1 Two interlaboratory tests have been run for these tensile properties. The first was run for modulus only, in 1977, in which randomly drawn samples of four thin (~0.025 mm (0.001-in.)) materials were tested with five specimens in each laboratory. Elastic (tangent) modulus measurements were made by six laboratories, and secant (1%) modulus measurements were taken by five laboratories. The relative precision obtained in this interlaboratory study is in Table 2.

13.1.1 In deriving the estimates in Table 2, statistical outliers were not removed, in keeping with Practice E691.⁵

13.1.2 The within-lab standard deviation of a mean value, $S_{\bar{x}}$, in each case was determined from the standard deviation, S_x , of the five individual specimens as follows: $S_{\bar{x}} = S_x/(5)^{1/2}$. The S_x values were pooled among laboratories for a given material to obtain the within-lab standard deviation, S_w , of a test result (mean of five specimens). See 13.3–13.3.2 for definitions of terms in the tables.

⁵ Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR:D20-1084.

TABLE 3 Precision Data for Yield Stress

| Material | Thickness, mils | Average, 10 ³ psi | (S _r) ^a 10 ³ psi | (S _R) ^b 10 ³ psi | I _r ^c 10 ³ psi | I _R ^d 10 ³ psi |
|----------|-----------------|------------------------------|--|--|---|---|
| LDPE | 1.0 | 1.49 | 0.051 | 0.13 | 0.14 | 0.37 |
| HDPE | 1.0 | 4.33 | 0.084 | 0.16 | 0.24 | 0.44 |
| PP | 0.75 | 6.40 | 0.13 | 0.52 | 0.37 | 1.46 |
| PC | 4.0 | 8.59 | 0.072 | 0.29 | 0.20 | 0.82 |
| CTA | 5.3 | 11.4 | 0.12 | 0.50 | 0.34 | 1.43 |
| PET | 4.0 | 14.3 | 0.12 | 0.23 | 0.34 | 0.66 |
| PET | 2.5 | 14.4 | 0.14 | 0.54 | 0.40 | 1.52 |
| PET | 7.0 | 14.4 | 0.13 | 0.36 | 0.37 | 1.03 |

^a S_r is the within-laboratory standard deviation of the average.

^b S_R is the between-laboratories standard deviation of the average.

^c I_r = 2.83 S_r.

^d I_R = 2.83 S_R.

13.2 An interlaboratory test was run for all the other tensile properties except modulus in 1981, in which randomly drawn samples of six materials (one of these in three thicknesses) ranging in thickness from 0.019 to 0.178 mm (0.00075 to 0.007 in.) were tested in seven laboratories. A test result was defined as the mean of five specimen determinations. However, each laboratory tested eight specimens, and the S_x was determined from S_x = S_y/(5)^{1/2} as above. This was done to improve the quality of the statistics while maintaining their applicability to a five-specimen test result. The materials and their thicknesses are identified in Tables 3-7, each of which contain data for one of the following properties: tensile yield strength, yield elongation, tensile strength, tensile elongation at break, and tensile energy at break (see Note 20).⁶

Note 20—Subsequent to filing the research report, examination of the LDPE used in this study between crossed polarizers revealed lengthwise lines representing substantial widthwise variation in molecular orientation that probably was not successfully randomized out of the between-labs component of variance.

13.3 For the purpose of compiling summary statistics, a test result has been defined to be the average of five replicate measurements of a property for a material in a laboratory, as specified in this test method. Summary statistics are given in Table 3. In each table, for the material indicated, S(r) is the pooled within-laboratory standard deviation of a test result, S(R) is the between-laboratory standard deviation of a test result, where r equals 2.83 × S(r) (see 13.3.1) and R equals 2.83 × S(R) (see 13.3.2). (Warning—The following explanations of I_r and I_R (13.3-13.3.3) are only intended to present a

meaningful way of considering the *Approximate* precision of this test method. The data in Table 2 should not be rigorously applied to the acceptance or rejection of material, as those data are specific to the round robin and may not be representative of other lots, conditions, materials, or laboratories. Users of this test method should apply the principles outlined in Practice E691 to generate data specific to their laboratory and materials, or between specific laboratories. The principles of 13.3-13.3.3 would then be valid for such data.)

13.3.1 *Repeatability*, I_r (Comparing two test results for the same material, obtained by the same operator using the same equipment on the same day)—The two test results shall be judged not equivalent if they differ by more than the I_r value for that material.

13.3.2 *Reproducibility*—In comparing two mean values for the same material obtained by different operators using different equipment on different days, either in the same laboratory or in different laboratories, the means shall be judged not equivalent if they differ by more than the R value for that material.

13.3.3 Any judgment made in accordance with 13.3.1 and 13.3.2 shall have an approximate 95 % (0.95) probability of being correct.

13.3.4 For further information, see Practice E691.

13.4 *Bias*—The systematic error which contributes to the difference between a test result and a true (or reference) value. There are no recognized standards on which to base an estimate of bias for these test methods.

14. Keywords

14.1 modulus of elasticity; plastic film; plastic sheeting; tensile properties; tensile strength; toughness; yield stress

⁶ Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR-D20-1101.

TABLE 4 Precision Data for Yield Elongation

| Material | Thickness, mils | Average, % | $(S_y)^A$, % | $(S_y)^B$, % | $(\bar{r})^C$, % | $(\bar{r})^D$, % |
|----------|-----------------|------------|---------------|---------------|-------------------|-------------------|
| PP | 0.75 | 3.5 | 0.15 | 0.41 | 0.42 | 1.2 |
| PET | 2.5 | 5.2 | 0.26 | 0.92 | 0.74 | 2.6 |
| PET | 4.0 | 5.3 | 0.25 | 0.60 | 0.71 | 1.7 |
| PET | 7.0 | 5.4 | 0.14 | 1.05 | 0.40 | 3.0 |
| CTA | 5.3 | 5.4 | 0.19 | 0.99 | 0.54 | 2.8 |
| PC | 4.0 | 6.0 | 0.24 | 0.98 | 0.68 | 2.8 |
| HDPE | 1.0 | 8.8 | 0.32 | 1.82 | 0.91 | 5.2 |
| LDPE | 1.0 | 10.0 | 0.55 | 3.41 | 1.56 | 9.6 |

Note: 1—See Table 3 for footnote explanation.

TABLE 5 Precision Data for Tensile Strength

| Material | Thickness, mils | Average, 10^3 psi | $(S_t)^A$, 10^3 psi | $(S_t)^B$, 10^3 psi | $(\bar{r})^C$, 10^3 psi | $(\bar{r})^D$, 10^3 psi |
|----------|-----------------|---------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| LDPE | 1.0 | 3.42 | 0.14 | 0.53 | 0.40 | 1.5 |
| HDPE | 1.0 | 6.87 | 0.27 | 0.81 | 0.76 | 2.3 |
| PC | 4.0 | 12.0 | 0.34 | 0.93 | 0.96 | 2.6 |
| CTA | 5.3 | 14.6 | 0.20 | 1.37 | 0.57 | 3.9 |
| PP | 0.75 | 28.4 | 1.57 | 4.56 | 4.4 | 12.9 |
| PET | 4.0 | 28.9 | 0.65 | 1.27 | 1.8 | 3.6 |
| PET | 7.0 | 30.3 | 0.83 | 1.32 | 2.3 | 3.7 |
| PET | 2.5 | 30.6 | 1.22 | 2.64 | 3.4 | 7.5 |

Note: 1—See Table 3 for footnote explanation.

TABLE 6 Precision Data for Elongation at Break

| Material | Thickness, mils | Average, % | $(S_b)^A$, % | $(S_b)^B$, % | $(\bar{r})^C$, % | $(\bar{r})^D$, % |
|----------|-----------------|------------|---------------|---------------|-------------------|-------------------|
| CTA | 5.3 | 26.4 | 1.0 | 4.3 | 3 | 12 |
| PP | 0.75 | 57.8 | 4.4 | 12.7 | 12 | 36 |
| PET | 2.5 | 120 | 8.0 | 14.6 | 23 | 41 |
| PET | 7.0 | 132 | 5.8 | 10.6 | 16 | 30 |
| PET | 4.0 | 134 | 4.4 | 12.2 | 12 | 35 |
| PC | 4.0 | 155 | 5.4 | 17.1 | 15 | 48 |
| LDPE | 1.0 | 205 | 24.4 | 73.3 | 69 | 210 |
| HDPE | 1.0 | 570 | 26.0 | 91.7 | 74 | 260 |

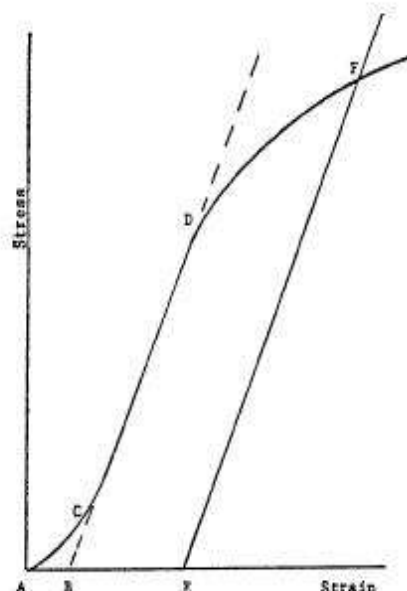
Note: 1—See Table 3 for footnote explanation.

TABLE 7 Precision Data for Tensile Energy to Break

| Material | Thickness, mils | Average, 10^3 $\frac{ft \cdot lb}{in^2}$ | $(S_E)^A$, 10^3 $\frac{ft \cdot lb}{in^2}$ | $(S_E)^B$, 10^3 $\frac{ft \cdot lb}{in^2}$ | $(\bar{r})^C$, 10^3 $\frac{ft \cdot lb}{in^2}$ | $(\bar{r})^D$, 10^3 $\frac{ft \cdot lb}{in^2}$ |
|----------|-----------------|---|--|--|--|--|
| CTA | 5.0 | 3.14 | 0.14 | 0.70 | 0.4 | 2.0 |
| LDPE | 1.0 | 5.55 | 0.84 | 2.47 | 2.4 | 7.0 |
| PP | 0.75 | 11.3 | 1.19 | 3.11 | 3.4 | 8.8 |
| PC | 4.0 | 12.9 | 0.59 | 1.55 | 1.7 | 4.4 |
| HDPE | 1.0 | 26.0 | 1.87 | 5.02 | 5.3 | 14.2 |
| PET | 2.5 | 26.1 | 2.13 | 4.20 | 6.0 | 11.9 |
| PET | 4.0 | 27.1 | 1.42 | 2.75 | 4.0 | 7.9 |
| PET | 7.0 | 28.4 | 1.71 | 2.72 | 4.8 | 7.7 |

Note: 1—See Table 3 for footnote explanation.

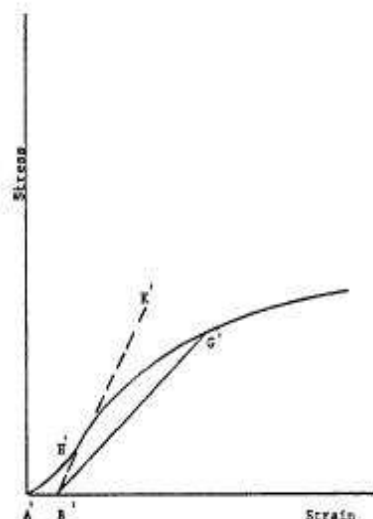
A1. TOE COMPENSATION



NOTE 1—Some chart recorders plot the mirror image of this graph.
FIG. A1.1 Material with Hookean Region

A1.1 In a typical stress-strain curve (Fig. A1.1) there is a toe region, AC, which does not represent a property of the material. It is an artifact caused by a takeup of slack, and alignment or seating of the specimen. In order to obtain correct values of such parameters as modulus, strain, and offset yield point, this artifact must be compensated for to give the corrected zero point on the strain or extension axis.

A1.2 In the case of a material exhibiting a region of Hookean (linear) behavior (Fig. A1.1), a continuation of the linear (CD) region of the curve is constructed through the zero-stress axis. This intersection (B) is the corrected zero-strain point from which all extensions or strains must be



NOTE 1—Some chart recorders plot the mirror image of this graph.
FIG. A1.2 Material with No Hookean Region

measured, including the yield offset (BE), if applicable. The elastic modulus can be determined by dividing the stress at any point along the line CD (or its extension) by the strain at the same point (measured from point B, defined as zero-strain).

A1.3 In the case of a material that does not exhibit any linear region (Fig. A1.2), the same kind of toe correction of the zero-strain point can be made by constructing a tangent to the maximum slope at the inflection point (H'). This is extended to intersect the strain axis at point B', the corrected zero-strain point. Using point B' as zero strain, the stress at any point (G') on the curve can be divided by the strain at that point to obtain a secant modulus (slope of line B'G'). For those materials with no linear region, any attempt to use the tangent through the inflection point as a basis for determination of an offset yield point can result in unacceptable error.

A2. DETERMINATION OF TENSILE ENERGY TO BREAK

A2.1 Tensile energy to break (TEB) is defined by the area under the stress-strain curve, or

$$TEB = \int_0^{\epsilon_T} S \, d\epsilon \quad (A2.1)$$

where S is the stress at any strain, ϵ , and ϵ_T is the strain at rupture. The value is in units of energy per unit volume of the specimen's initial gage region. TEB is most conveniently and accurately measured with a tension tester equipped with an integrator. The calculation is then:

$$TEB = (I/K) \frac{(\text{full scale load}) (\text{chart speed}) (\text{crosshead speed/chart speed})}{(\text{mean caliper}) (\text{specimen width}) (\text{gage length})} \quad (A2.2)$$

where I is the integrator count reading and K is the maximum possible count per unit time for a constant full scale load. This whole calculation is typically done electronically. The results are best expressed in megajoules per cubic metre (or inch-pounds-force per cubic inch).

A2.2 Without an integrator, the area under the recorded stress-strain curve can be measured by planimeter, counting squares, or weighing the cut-out curve. These techniques are time-consuming and likely to be less accurate, since the load scale on some chart paper is not in round-number dimensions. Moreover, if the curve coordinates are in terms of force and extension instead of stress and strain, the calculated energy, corresponding to the measured area, must be divided by the product of gage length, specimen width, and mean caliper:

$$TEB = \frac{(\text{curve area}) (\text{force per unit chart scale})}{(\text{extension per unit chart travel}) (\text{mean caliper}) (\text{specimen width}) (\text{gage length})} \quad (\text{A2.3})$$

A2.3 For example, if the area under a force-extension curve is 60 000 mm², the load coordinate is 2.0 N/mm of chart scale, the extension coordinate is 0.25 mm of extension per mm of chart travel, and the specimen dimensions are 0.1 mm caliper, 15 mm width and 100 mm gage length, then the calculation for tensile energy to break is:

$$TEB = \frac{(60\,000\text{ mm}^2) (2.0\text{ N/mm}) (0.25 \times 10^{-3}\text{ m/mm})}{(0.1 \times 10^{-3}\text{ m}) (15 \times 10^{-3}\text{ m}) (100 \times 10^{-3}\text{ m})} \quad (\text{A2.4})$$

$$TEB = 200\text{ MJ/m}^3$$

SUMMARY OF CHANGES

Committee D20 has identified the location of selected changes to this standard since the last issue (D882 - 09) that may impact the use of this standard. (April 1, 2010)

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> (7) Subcommittee D20.19 is now responsible for this standard. (2) Removed subsection 1.2.1. (3) Added Practice D6988 and Terminology D883 to Referenced Documents section. (4) Added 3.1.2. (5) Added 5.5.3 | <ul style="list-style-type: none"> (6) Added 8.3. (7) Renumbered original 8.3 as 8.4. (8) Notes 5, 6, and 7 were added. All other notes were renumbered. (9) Permissive language was removed throughout the standard. |
|---|---|

Committee D20 has identified the location of selected changes to this standard since the last issue (D882 - 02) that may impact the use of this standard. (January 1, 2009)

- (7) Revised Section 7.

ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.

This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.

This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19380-2959, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-0585 (phone), 610-832-0555 (fax), or service@astm.org (e-mail); or through the ASTM website (www.astm.org). Permission rights to photocopy the standard may also be secured from the ASTM website (www.astm.org) COPYRIGHT 17.

ANEXO B. Material safety data sheet (msds) dióxido de silicio (SiO₂)



| | |
|---------------------|---|
| Health | 1 |
| Fire | 0 |
| Reactivity | 0 |
| Personal Protection | E |

Material Safety Data Sheet Aerosil 200 MSDS

Section 1: Chemical Product and Company Identification

Product Name: Aerosil 200

Catalog Codes: SLA4144

CAS#: 7631-86-9 or 112945-52-5. Note that the new CAS no. of 112945-52-5 has been assigned to Amorphous Fumed Silica.

RTECS: VV7310000

TSCA: TSCA 8(b) inventory: Aerosil 200

CI#: Not available.

Synonym: Aerosil 200; Amorphous Fumed Silica; Aerosil 90, 130, 150, 255, 300, 325, 380, 90VS, 150 VS, 200V, 300VV120, 200VS, 255VS, 300VS, 380VS, 400VS, FLM, FLM VS, OX50

Chemical Name: Silicon Dioxide

Chemical Formula: SiO₂

Contact Information:

Sciencelab.com, Inc.

14025 Smith Rd.

Houston, Texas 77396

US Sales: 1-800-901-7247

International Sales: 1-281-441-4400

Order Online: ScienceLab.com

CHEMTREC (24HR Emergency Telephone), call: 1-800-424-9300

International CHEMTREC, call: 1-703-527-3887

For non-emergency assistance, call: 1-281-441-4400

Section 2: Composition and Information on Ingredients

Composition:

| Name | CAS # | % by Weight |
|-------------|-----------|-------------|
| Aerosil 200 | 7631-86-9 | 100 |

Toxicological Data on Ingredients: Not applicable.

Section 3: Hazards Identification

Potential Acute Health Effects: Slightly hazardous in case of skin contact (irritant), of eye contact (irritant), of ingestion, of inhalation.

Potential Chronic Health Effects:

CARCINOGENIC EFFECTS: 3 (Not classifiable for human.) by IARC. MUTAGENIC EFFECTS: Not available. TERATOGENIC EFFECTS: Not available. DEVELOPMENTAL TOXICITY: Not available. Repeated or prolonged exposure is not known to aggravate medical condition.

Section 4: First Aid Measures

Eye Contact:

Check for and remove any contact lenses. In case of contact, immediately flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes. Get medical attention if irritation occurs.

Skin Contact: Wash with soap and water. Cover the irritated skin with an emollient. Get medical attention if irritation develops.

Serious Skin Contact: Not available.

Inhalation:

If inhaled, remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen. Get medical attention.

Serious Inhalation: Not available.

Ingestion:

Do NOT induce vomiting unless directed to do so by medical personnel. Never give anything by mouth to an unconscious person. Loosen tight clothing such as a collar, tie, belt or waistband. Get medical attention if symptoms appear.

Serious Ingestion: Not available.

Section 5: Fire and Explosion Data

Flammability of the Product: Non-flammable.

Auto-Ignition Temperature: Not applicable.

Flash Points: Not applicable.

Flammable Limits: Not applicable.

Products of Combustion: Not available.

Fire Hazards in Presence of Various Substances: Not applicable.

Explosion Hazards in Presence of Various Substances:

Risks of explosion of the product in presence of mechanical impact: Not available. Risks of explosion of the product in presence of static discharge: Not available.

Fire Fighting Media and Instructions: Not applicable.

Special Remarks on Fire Hazards: Not available.

Special Remarks on Explosion Hazards:

Heating a mixture of powdered magnesium and silica (later found not to be absolutely dry) cause a violent explosion rather than the vigorous reaction anticipated.

Section 6: Accidental Release Measures

Small Spill:

Use appropriate tools to put the spilled solid in a convenient waste disposal container. Finish cleaning by spreading water on the contaminated surface and dispose of according to local and regional authority requirements.

Large Spill:

Use a shovel to put the material into a convenient waste disposal container. Finish cleaning by spreading water on the contaminated surface and allow to evacuate through the sanitary system. Be careful that the product is not present at a concentration level above TLV. Check TLV on the MSDS and with local authorities.

Do not ingest. Do not breathe dust. If ingested, seek medical advice immediately and show the container or the label.

Storage: Keep container tightly closed. Keep container in a cool, well-ventilated area. Do not store above 23°C (73.4°F).

Section 8: Exposure Controls/Personal Protection

Engineering Controls:

Use process enclosures, local exhaust ventilation, or other engineering controls to keep airborne levels below recommended exposure limits. If user operations generate dust, fume or mist, use ventilation to keep exposure to airborne contaminants below the exposure limit.

Personal Protection: Safety glasses. Lab coat. Dust respirator. Be sure to use an approved/certified respirator or equivalent. Gloves.

Personal Protection in Case of a Large Spill:

Splash goggles. Full suit. Dust respirator. Boots. Gloves. A self contained breathing apparatus should be used to avoid inhalation of the product. Suggested protective clothing might not be sufficient; consult a specialist BEFORE handling this product.

Exposure Limits:

TWA: 6 (mg/m3) [United Kingdom (UK)] Inhalation Total. TWA: 2.4 (mg/m3) [United Kingdom (UK)] Inhalation Respirable. TWA: 6 (mg/m3) from NIOSH [United States] [1997] Inhalation TWA: 2 (mg/m3) [Australia] Inhalation Respirable. Consult local authorities for acceptable exposure limits.

Section 9: Physical and Chemical Properties

Physical state and appearance: Solid. (Powdered solid.)

Odor: Odorless.

Taste: Tasteless.

Molecular Weight: Not available.

Color: White.

pH (1% soln/water): Not available.

Boiling Point: Not available.

Melting Point: 1610°C (2930°F)

Critical Temperature: Not available.

Specific Gravity: 2.2 (Water = 1)

Vapor Pressure: Not applicable.

Vapor Density: Not available.

Volatility: Not available.

Odor Threshold: Not available.

Water/Oil Dist. Coeff.: Not available.

Ionicity (in Water): Not available.

Dispersion Properties: Not available.

Solubility: Not available.

Section 10: Stability and Reactivity Data

Stability: The product is stable.

Instability Temperature: Not available.

Conditions of Instability: Not available.

Incompatibility with various substances: Not available.

Corrosivity: Not considered to be corrosive for metals and glass.

Special Remarks on Reactivity:

Incompatible with Fluoride, oxygen, difluoride, chlorine trifluoride. Vinyl acetate vapor may react vigorously in contact with silica gel.

Special Remarks on Corrosivity: Not available.

Polymerization: Will not occur.

Section 11: Toxicological Information

Routes of Entry: Inhalation, Ingestion.

Toxicity to Animals: Acute oral toxicity (LD50): 3160 mg/kg [Rat].

Chronic Effects on Humans: CARCINOGENIC EFFECTS: 3 (Not classifiable for human.) by IARC.

Other Toxic Effects on Humans: Slightly hazardous in case of skin contact (irritant), of ingestion, of inhalation.

Special Remarks on Toxicity to Animals: Not available.

Special Remarks on Chronic Effects on Humans: Not available.

Special Remarks on other Toxic Effects on Humans:

Acute Potential Health Effects: Skin: May cause irritation and drying of the skin. Eye: Dust may cause eye irritation and discomfort. Inhalation: Dust may cause respiratory tract irritation and discomfort. Ingestion: Not expected to be very toxic.
Chronic Potential Health Effects: No chronic (long term) effects are known for humans.

Section 12: Ecological Information

Ecotoxicity: Not available.

BOD5 and COD: Not available.

Products of Biodegradation:

Possibly hazardous short term degradation products are not likely. However, long term degradation products may arise.

Toxicity of the Products of Biodegradation: The product itself and its products of degradation are not toxic.

Special Remarks on the Products of Biodegradation: Not available.

Section 13: Disposal Considerations

Waste Disposal:

Section 14: Transport Information

DOT Classification: Not a DOT controlled material (United States).

Identification: Not applicable.

Special Provisions for Transport: Not applicable.

Section 15: Other Regulatory Information

Federal and State Regulations:

Pennsylvania RTK: Aerosil 200 Florida: Aerosil 200 Minnesota: Aerosil 200 Massachusetts RTK: Aerosil 200 New Jersey: Aerosil 200 California Director's List of Hazardous Substances (8 CCR 339): Aerosil 200 TSCA 8(b) inventory: Aerosil 200

Other Regulations: EINECS: This product is on the European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances.

Other Classifications:

WHMIS (Canada): Not controlled under WHMIS (Canada).

DSCL (EEC):

This product is not classified according to the EU regulations. S24/25- Avoid contact with skin and eyes.

HMIS (U.S.A.):

Health Hazard: 1

Fire Hazard: 0

Reactivity: 0

Personal Protection: E

National Fire Protection Association (U.S.A.):

Health: 1

Flammability: 0

Reactivity: 0

Specific hazard:

Protective Equipment:

Gloves. Lab coat. Dust respirator. Be sure to use an approved/certified respirator or equivalent. Safety glasses.

Section 16: Other Information

References: Not available.

Other Special Considerations: Not available.

Created: 10/11/2005 01:00 PM

Last Updated: 11/01/2010 12:00 PM

The information above is believed to be accurate and represents the best information currently available to us. However, we make no warranty of merchantability or any other warranty, express or implied, with respect to such information, and we assume no liability resulting from its use. Users should make their own investigations to determine the suitability of the information for their particular purposes. In no event shall ScienceLab.com be liable for any claims, losses, or damages of any third party or for lost profits or any special, indirect, incidental, consequential or exemplary damages, howsoever arising, even if ScienceLab.com has been advised of the possibility of such damages.

ANEXO C. Formulario de consentimiento informado

TÍTULO: OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS BASADAS EN DIÓXIDO DE SILICIO ENCAPSULADO EN UNA MATRIZ DE QUITOSANO Y GLICEROL ORGÁNICO A TRAVÉS DEL MÉTODO DE EVAPORACIÓN LENTA PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS.

PROTOCOLO No: 00001.

INVESTIGADORES: Oscar Mauricio Vélez Tabares y Wilson Fernando Pantoja Yela.

DIRECCIÓN: Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Occidente

INTRODUCCIÓN: Los investigadores han determinado que Ud. reúne los requisitos principales para participar en el estudio de esta investigación. La siguiente información describe el estudio a realizar y su función como participante en este. Un investigador del grupo explicará los procedimientos y atenderá cualquier duda acerca de este formulario. Lea detenida y cuidadosamente este documento.

OBJETIVO DEL ESTUDIO: En este estudio se determinará la viabilidad celular de las películas poliméricas de quitosano, glicerol de maíz y dióxido de silicio con la sangre que Ud. ofrece como muestra para las pruebas de citotoxicidad.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS: La muestra de sangre será extraída, marcada y manipulada únicamente por la persona que ha sido asignada para tal función.

Este estudio se llevara a cabo con la participación de 5 personas mayores de edad; 1 hombre y 4 mujeres.

Luego de haber sido Ud. seleccionado a participar en el estudio, será expuesto a una extracción de sangre por venopunción realizada por personal calificado, la cual será depositada y almacenada luego para su conservación.

◎ EXTRACCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA POR VENOPUNCIÓN:

El donante no debe presentar alguna enfermedad infecciosa o contagiosa que active el sistema inmune dentro de los 60 días previos a la extracción.

Se obtendrán 10mL de sangre por venopunción, una vez aceptado y firmado el consentimiento informado por parte del donante

◎ PREPARACIÓN DE MUESTRAS DESPUÉS DE CENTRIFUGACIÓN (SEPARACIÓN Y LAVADOS):

En un tubo de ensayo de 20mL colocar 10mL de histopaque marca Sigma-Aldrich ref. 1077, añadir en la superficie del histopaque los 10mL de sangre periférica obtenidos. Centrifugar los tubos a 400 gravedades durante 30 minutos a temperatura ambiente (27°C) con el objetivo de separar las cadenas de linfocitos.

Con una micropipeta se extrae el anillo de células (linfocitos) que queda en la interface entre el sangre y el histopaque del tubo (aproximadamente 800µL), tratando de arrastrar la menor cantidad posible de reactivo.

Adicionar a cada tubo 3800µL de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido, con 5% de suero fetal bovino equivalente a 190µL; realizar una disociación (mezclar los linfocitos con el medio) para luego llevar a un primer lavado en centrifugadora a 250 gravedades (2.190rpm), por 10 minutos a 27°C.

Retirar el sobrenadante de cada uno de los tubos y realizar un segundo lavado en centrifugadora con las mismas especificaciones que el anterior.

◎ PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CONTEOS PRE Y POS:

Retirar el material precipitado (linfocitos) en cada tubo. Preparar una solución compuesta de 20mL de RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% que equivale a 2mL, penicilina 50µg/mL equivalente a 1000µL y gentamicina 10µg/mL que equivale a 200µL; esta solución se divide por igual en el numero de muestras que se requiera, luego se disocia nuevamente la cantidad de linfocitos agregada junto con la solución para iniciar el primer conteo.

Se extrae 100µL del cultivo y se mezclan en un tubo *eppendorf* que contiene 100µL de azul de *tripán* al 4% dejándolos reposar durante 5min máximo (el azul de *tripán* se prepara con 100mL de agua autoclavada por 30min, agregando 0.04g de azul de *tripán* en polvo); se retira una cantidad adecuada de la mezcla del cultivo con el tinte, y se coloca en la cámara de *newbauer* con la micropipeta en ambas matrices de evaluación, para proceder al conteo con el microscopio en escalas 40X y 100X, centrándose en los recuadros de las esquinas de la matriz.

El cultivo que se está incubando en la cámara de CO₂ se pone en contacto con las películas poliméricas y se deja cultivando durante 24 horas, para luego hacer el conteo con el mismo procedimiento que se desarrollo anteriormente utilizando el tinte azul de *tripán*, en las mismas cantidades y bajo las mismas condiciones en la cámara de *newbauer*.

A continuación, debe replicarse este paso después de 48 y 72 horas bajo las mismas condiciones sobre la cámara de *newbauer*; para luego comparar con el primer conteo.

RIESGOS Y MOLESTIAS: la recolección del material sanguíneo para este estudio en general no implica riesgos. Sin embargo, se le explicarán las molestias, riesgos razonables y previsibles de la participación.

ALTERNATIVAS: la participación en este estudio no es obligatoria. Puesto que Ud. Podrá decidir si quiere o no hacerlo, en caso que crea que le genere algún tipo de riesgo.

POSIBLES BENEFICIOS PARA LOS PARTICIPANTES: no hay garantía de que Ud. personalmente recibirá un beneficio por participar en este estudio; su participación en esta investigación proporcionará información acerca de la viabilidad celular de las películas poliméricas con el entorno fisiológico, estos resultados podrían beneficiar a otros.

COSTOS: La participación en esta investigación, procedimientos y controles que se le realizaran a las muestras, no representará ningún costo para el participante.

No existe ninguna forma de compensación o retribución monetaria por el tiempo dedicado en la investigación.

COMPENSACIÓN POR EFECTOS COLATERALES RESULTANTES DEL

ESTUDIO: Si Ud. sufre algún daño o enfermedad directa por la toma de la muestra de sangre como resultado de su participación en la investigación, los investigadores cubrirán los gastos para su tratamiento.

La firma de este consentimiento no implica su renuncia a ninguno de los derechos previstos por la normativa vigente para el caso de daños relacionados con su participación en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD: Los registros de su participación en esta investigación se mantendrán confidenciales en la medida permitida por las leyes locales. Los encargados del estudio, y directores del mismo podrán inspeccionar y tendrán acceso a los datos confidenciales que lo identifican a Ud. por su nombre. Los Comités de Ética/Docencia e Investigación son comités que evalúan los estudios para garantizar que se protejan los derechos y el bienestar de los participantes y que la investigación se lleve a cabo éticamente. Dada la necesidad de entregar información a estos organismos, no puede garantizarse una absoluta confidencialidad. Ud. no será identificado en ninguna publicación de los datos. Al firmar este formulario de consentimiento, Ud. autoriza a los investigadores revelar sus registros médicos relacionados con la investigación a las personas arriba mencionadas.

A QUIÉN DIRIGIR LAS PREGUNTAS RELATIVAS A ESTE ESTUDIO: Ud. Tiene el derecho de hacer preguntas sobre el estudio que se va a realizar en cualquier momento. El encargado del estudio será informado acerca de toda nueva información relativa a su seguridad.

Si tiene alguna pregunta relativa a este estudio o si presenta un daño o enfermedad relacionado con la investigación, contacte a los investigadores Oscar Mauricio Vélez Tabares 3173480751 y/o Wilson Fernando Pantoja Yela 3122869273.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y DERECHO DE NEGARSE O RETIRARSE:

Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. podrá negarse o discontinuar su participación en cualquier momento durante el estudio, sin penalidad ni pérdida de beneficios.

DESCONTINUACIÓN DE SU PARTICIPACIÓN: Su participación podrá ser discontinuada por los investigadores, sin su consentimiento si Ud. deja de reunir los criterios o no cumple con las instrucciones del estudio que se le indicaron en cuanto a su cuidado o con los requerimientos del estudio, si sufre un daño relacionado con el estudio, o por cualquier otro motiv

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Yo, _____, identificado con la cédula No. _____ de _____, he comprendido toda la información que se me suministró acerca de mi participación en este estudio. He tenido la oportunidad de comentar dicha información y hacer preguntas. Todas ellas han sido respondidas a mi satisfacción. Acepto de plena voluntad participar en este estudio. Recibiré una copia firmada de ésta declaración de consentimiento informado.

La decisión de aceptar participar en este estudio de investigación no anula ninguno de sus derechos en el caso de negligencia u otra responsabilidad legal de las personas involucradas en este estudio.

Autorizo a que se revelen los registros de los resultados a los directores de la investigación.

Nombre del paciente

Fecha/hora de firma

**Firma de la persona que
obtiene el consentimiento**

Fecha/hora de firma

Firma del Testigo

Fecha/hora de firma

ANEXO D. Procedimiento de la técnica azul de tripán para evaluar biocompatibilidad celular

• EXTRACCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA POR VENOPUNCIÓN:

Obtener 10ml de sangre por venopunción, previo consentimiento informado del donante de la muestra; se debe tener en cuenta que el donante no debe presentar alguna enfermedad infecciosa o contagiosa que active el sistema inmune dentro de los 60 días previos.

• PREPARACIÓN DE MUESTRAS DESPUÉS DE CENTRIFUGACIÓN (SEPARACIÓN Y LAVADOS):

En un tubo de 20ml colocar 10ml de histopaque marca Sigma-Aldrich ref. 1077 y luego añadir en la superficie del histopaque los 10ml de sangre periférica obtenidos. Centrifugar los tubos a 400 gravedades durante 30 minutos a temperatura ambiente (27°C) con el objetivo de separar los linfocitos.

Extraer con una micropipeta el anillo de células (linfocitos) que queda en la interface entre el suero y el histopaque del tubo (aproximadamente 800µl), tratando de arrastrar la menor cantidad posible del reactivo.

Añadir a cada tubo 3800µl de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido, con 5% de suero fetal bovino equivalente a 190µl; realizar una disociación (mezclar los linfocitos de forma homogénea con el medio) para luego llevar a un primer lavado en centrifugadora a 250 gravedades (2.190rpm), por 10 minutos a 27°C. Retirar el sobrenadante de cada uno de los tubos *eppendorf* y realizar un segundo lavado en centrifugadora con las mismas especificaciones que el primero.

• PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CONTEOS PRE Y POS:

Retirar el material precipitado (linfocitos) en cada tubo *eppendorf*. Preparar una solución compuesta de 20ml de RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% que equivale a 2ml, penicilina 50µg/ml equivalente a 1000µl y gentamicina 10µg/ml que equivale a 200µl; esta solución se divide por igual en el numero de muestras que se requiera, luego se disocia nuevamente la cantidad de linfocitos agregada junto con la solución para iniciar el primer conteo. Se hace la extracción de 100µl del cultivo y se mezclan en un tubo

eppendorf que contiene 100µl de azul de *tripán* al 4% dejándolos reposar durante 5min máximo (el azul de *tripán* se prepara con 100ml de agua autoclavada por 30min, agregando 0.04g de azul de *tripán* en polvo); se retira una cantidad adecuada de la mezcla del cultivo con el tinte, y se coloca en la cámara de *newbauer* con la micropipeta por ambas matrices de evaluación, para proceder al conteo con el microscopio en escalas 40X y 100X, centrándose en los recuadros de las esquinas de la matriz.

Posteriormente el cultivo que se está incubando en la cámara de CO₂ se pone en contacto con el material a evaluar y se deja cultivando durante 24 horas, para luego hacer el conteo con el mismo procedimiento que se desarrollo anteriormente utilizando el tinte azul de *tripán*, en las mismas cantidades y bajo las mismas condiciones en la cámara de *newbauer*.

A continuación, debe replicarse este paso después de 48 y 72 horas después bajo las mismas condiciones sobre la cámara de *newbauer*; para luego comparar con el primer conteo.

Certificate of Analysis

Product Name:

Chitosan (Coarse ground flakes and powder)

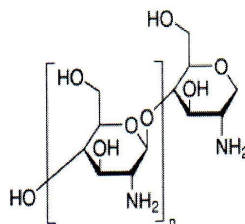
Product Number: 419419

Lot Number: MKBD7240V

Brand: ALDRICH

CAS Number: 9012-76-4

MDL Number: MFCD00161512

Formula: C₁₂H₂₄N₂O₉

| Test | Specification | Result |
|------------------------------|--------------------------|---------|
| Appearance (Color) | Conforms to Requirements | Beige |
| Off-White to Beige to Orange | | |
| Appearance (Form) | Conforms to Requirements | Powder |
| Flakes or Powder | | |
| Assay | ≥ 75.0% | 78.0% |
| Decetylation | | |
| Viscosity | 800 - 2000cps | 1218cps |
| c = 1%; 1% Acetic Acid | | |

Jamie Gleason, Manager
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin US



Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.